

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Einfluss präanalytischer und analytischer Faktoren bei der
refraktometrischen Messung des urinspezifischen Gewichtes bei
Hunden und Katzen

von Martina Katharina Mösch
aus Schwetzingen

München 2020

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Roswitha Dorsch

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Roswitha Dorsch

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Hartmut Gerhards

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1.	Physiologie der Niere	3
1.1.	Funktionelle Morphologie der Niere.....	3
1.1.1.	Nephron.....	4
1.1.1.1.	Glomerulus	4
1.1.1.2.	Bowman-Kapsel.....	5
1.1.1.3.	Tubulussystem.....	6
1.2.	Tubuläre Transportprozesse	6
1.2.1.	Proximaler Tubulus	7
1.2.2.	Henlesche Schleife	8
1.2.3.	Distaler Tubulus	9
1.2.4.	Sammelrohr	10
1.3.	Physiologische Vorgänge bei der Harnkonzentrierung.....	10
1.3.1.	Harnkonzentrierung in der Henleschen Schleife.....	11
1.3.2.	ADH-regulierte Wasserresorption.....	11
1.3.3.	Gegenstromprinzip der Vasa recta	13
1.3.4.	Harnstoffkreislauf.....	13
2.	Parameter zur Beurteilung der Harnkonzentrierung	14
2.1.	Urinspezifisches Gewicht.....	14
2.1.1.	Definition	14
2.1.1.1.	Refraktion.....	15
2.1.1.2.	Refraktiver Index/Refraktivität	16
2.1.2.	Einteilung des urinspezifischen Gewichtes.....	16
2.1.2.1.	Hypothenurie	16
2.1.2.2.	Isosthenurie	17
2.1.2.3.	Inadäquat konzentrierter Urin	17
2.1.2.4.	Hypersthenurie	17
2.2.	Osmolalität	18
2.2.1.	Definition	18
2.2.1.1.	Osmotische Lücke	18
2.2.2.	Einteilung der Osmolalität	19

2.3.	Korrelation zwischen urinspezifischem Gewicht und Osmolalität	19
3.	Methoden zur Messung der Harnkonzentrierung	20
3.1.	Messung des urinspezifischen Gewichtes	21
3.1.1.	Indirekte Methoden zur Messung des urinspezifischen Gewichtes	21
3.1.1.1.	Refraktometer	21
3.1.1.2.	Teststreifen	22
3.1.2.	Direkte Methoden zur Messung des urinspezifischen Gewichts	24
3.1.2.1.	Hydrometer	24
3.1.2.2.	Falling Drop	25
3.1.2.3.	Vibrating Capillar	26
3.2.	Messung der Osmolalität	26
3.2.1.	Osmometrie	26
3.2.1.1.	Gefrierpunktserniedrigung (Freezing point depression osmometer)	28
3.2.1.2.	Dampfdruckerniedrigung (Vapour pressure osmometer)	28
3.2.1.3.	Kolloid osmotischer Druck (Osmotic pressure)	29
3.2.1.4.	Siedepunkt (Boiling point)	30
4.	Einfluss verschiedener Parameter auf das USG	31
4.1.	Einfluss von Protein	31
4.2.	Einfluss von Glukose	32
4.3.	Einfluss der Temperatur	32
4.4.	Einfluss des pH-Wertes	33
4.5.	Einfluss von Röntgenkontrastmittel	34
4.6.	Einfluss der Lagerungszeit	34
III.	PUBLIKATION	36
IV.	DISKUSSION	45
V.	ZUSAMMENFASSUNG	55
VI.	SUMMARY	57
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	59
VIII.	ANHANG	74
IX.	DANKSAGUNG	76

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
®	registered trademark (registrierte Warenmarke)
≥	Vergleichszeichen: größer als oder gleich
<	Vergleichszeichen: kleiner als
°C	Grad Celsius
ADH	Antidiuretisches Hormon (Vasopressin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
CV	Variationskoeffizient (Coefficient of variation)
g	Gramm
g/dl	Gramm pro Deziliter
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
g/l	Gramm pro Liter
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat
H ₂ CO ₃	Kohlensäure
kg	Kilogramm
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LOA	Limits of agreement
ml	Milliliter
mol/l	Mol pro Liter
mmol/kg	Millimol pro Kilogramm
mmol/l	Millimol pro Liter
mOsm/kg	Milliosmol pro Kilogramm
mOsm/l	Milliosmol pro Liter
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NKCC2	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Cotransporter
nm	Nanometer
RBF	renaler Blutfluss
RPF	renaler Plasmafluss
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)
USG	urinspezifisches Gewicht
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Die Beurteilung der Fähigkeit der Niere, den Urin zu konzentrieren, stellt ein wichtiges diagnostisches Mittel dar, um akute und chronische Nierenerkrankungen zu diagnostizieren (GOUNDEN & NEWALL, 1983). Die Messung der Osmolalität wird als Goldstandard zur Evaluierung der Nierenkonzentrierungsfähigkeit betrachtet (BROCK et al., 2013; SOUZA et al., 2015). Die am meisten in der Praxis genutzte Methode zur Messung der renalen Konzentrierungsfähigkeit ist jedoch die Bestimmung des urinspezifischen Gewichtes (USG) (DOSSIN et al., 2003). Die Messung des USG erfolgt am häufigsten mittels Refraktometer oder Teststreifen. Die meisten Studien, die die Beziehung zwischen Osmolalität und Refraktometrie untersuchten, ermittelten eine gute Korrelation zwischen diesen beiden Methoden (DORIZZI et al., 1987; DOSSIN et al., 2003). Die Messung des USG mittels Refraktometer wird deshalb als geeignete Alternative zur Messung der Osmolalität angesehen (WATSON, 1998; CHADHA et al., 2001). Studien, die die Verlässlichkeit von Urinteststreifen zur Bestimmung des USG untersuchten, lieferten teils kontroverse Ergebnisse (FREW et al., 1982; ADAMS, 1983; GOUNDEN & NEWALL, 1983; DORIZZI et al., 1987). Das USG ist definiert als das Verhältnis des Gewichtes eines Volumens von Urin zum Gewicht deselben Volumens von destilliertem Wasser und wird durch die Anzahl, das molekulare Gewicht und die chemische Zusammensetzung der im Urin gelösten Teilchen beeinflusst (WATSON, 1998). Die Osmolalität entspricht der Konzentration aller gelösten Teilchen einer Lösung und wird nur durch die Anzahl der Partikel beeinflusst, weshalb größere Moleküle, wie Proteine, einen größeren Einfluss auf das USG als auf die Osmolalität haben sollten (CHADHA et al., 2001). Frühere Studien, die den Einfluss von Protein auf die Osmolalität und das USG untersuchten, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während VOINESCU und Mitarbeiter einen Einfluss von Protein auf das USG und die Osmolalität feststellten (VOINESCU et al., 2002), konnte dies in anderen Studien nicht bestätigt werden (IMRAN et al., 2010; AYOUB et al., 2013).

Da sich die refraktiven Indices im Urin von Hunden und Katzen unterscheiden, sind seit geraumer Zeit Refraktometer mit getrennten Skalen für Hunde- und Katzenurin erhältlich. Bisher haben wenige Studien die klinische Relevanz eines

Refraktometers mit separater Katzenskala für die Messung des USG von Katzenurin untersucht (BENNETT et al., 2011; TVEDTEN et al., 2015).

Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin, wird die Bestimmung des USG in der Regel mittels frischem Nativurin direkt nach der Uringewinnung durchgeführt. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Verwendung von Nativurin und Überstand zu unterschiedlichen Messergebnissen für das USG führen. Zudem gibt es keine Untersuchungen dazu, ob eine Lagerung über einen Zeitraum von mehreren Wochen oder Monaten einen Einfluss auf das USG hat.

Die Ziele dieser kumulativen Arbeit waren:

- der Vergleich zweier optischer Refraktometer: ein Refraktometer mit einheitlicher Skala für Hunde- und Katzenurinproben und ein Refraktometer mit getrennter Skala für Hunde- und Katzenurinproben
- die Bestimmung der Intra- und Interobserver-Variabilität
- die Untersuchung der Übereinstimmung des USG zwischen Nativurin und Überstand
- die Untersuchung der Korrelation zwischen USG und Osmolalität
- die Untersuchung des Proteineinflusses auf die Korrelation zwischen USG und Osmolalität
- die Untersuchung des Einflusses der Lagerungszeit von bis zu sechs Monaten auf das USG

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Physiologie der Niere

Die Nieren spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts sowie der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen und der Hormonproduktion (FINCO, 1995). Die Nieren sind sehr stark durchblutet (SCHWEIGHAUSER & FRANCEY, 2017). Pro Minute durchfließen circa (ca.) 20 Prozent (%) des Herzzeitvolumens die Nieren (LESLIE, 1986; BRAUN, 2006; SILBERNAGEL & DESPOPOULOS, 2007; MORITZ, 2013). Dies entspricht einem renalen Blutfluss (RBF) von etwa 20 Milliliter (ml) pro Minute pro Kilogramm (kg) Körpergewicht oder einem renalen Plasmafluss (RPF) von etwa 12 ml pro Minute pro kg Körpergewicht (FINCO, 1995). Dabei durchfließen etwa 90 % des renalen Blutes die Nierenrinde (LESLIE, 1986; BRAUN, 2006; MORITZ, 2013), etwa 1 % das innere Nierenmark und 7 % das äußere Nierenmark (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Das die Nieren passierende Blut wird in den Glomeruli filtriert, wodurch ein Ultrafiltrat gebildet wird (WATSON, 1998; BRAUN, 2006). Im Glomerulus findet eine Rückresorption von 99 % des produzierten Ultrafiltrats während der Tubuluspassage statt, wodurch nur eine geringe Menge als Urin ausgeschieden wird (DIBARTOLA, 2000a; BRAUN, 2006). Das pro Zeit in den Glomeruli filtrierte Flüssigkeitsvolumen wird als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bezeichnet (BRAUN, 2006; SILBERNAGEL & DESPOPOULOS, 2007; MORITZ, 2013).

1.1. Funktionelle Morphologie der Niere

Das anatomische und funktionelle Strukturelement der Niere ist das Nephron (OSBORNE & FLETCHER, 1995). Dieses setzt sich aus einem Nierenkörperchen (Glomerulus) und den sich anschließenden Nierenkanälchen (Tubuli) mit proximalem Tubulus, Henlescher Schleife und distalem Tubulus, der in ein Sammelrohr mündet, zusammen (FINCO, 1995; OSBORNE & FLETCHER, 1995; DIBARTOLA, 2000a; BRAUN, 2006). In der Nierenrinde (Cortex renalis) befinden sich die Glomeruli, während im Nierenmark (Medulla renalis) die Tubuli liegen (BRAUN, 2006).

1.1.1. Nephron

Die Anzahl der Nephrone ist tierartspezifisch. Die menschliche Niere besitzt etwa 1.000.000 Nephrone (ROSE & POST, 2001a; BRAUN, 2006). Die Niere eines Hundes enthält etwa 400.000 Nephrone und die Niere einer Katze besitzt etwa 190.000 Nephrone (OSBORNE & FLETCHER, 1995). Es werden nach ihrer Anordnung im Nierenparenchym tief (juxtamedulläre) in der Nierenrinde und oberflächlich (kortikale) in der Nierenrinde gelegene Nephrone unterschieden (BRAUN, 2006). Kortikale Nephrone haben kurze Henlesche Schleifen, während juxtamedulläre Nephrone lange Henlesche Schleifen besitzen, die tief in das Nierenmark reichen (OSBORNE & FLETCHER, 1995). Je länger die Henleschen Schleifen, desto größer ist ihre Fähigkeit, den Urin zu konzentrieren (BEVAN, 1978a; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004).

In jedem Nephron hängt die Bildung des Urins von drei Mechanismen ab: Glomerulärer Filtration, tubulärer Reabsorption und tubulärer Sekretion (FINCO, 1995).

1.1.1.1. Glomerulus

In den Glomeruli werden große Mengen an Ultrafiltrat produziert (OSBORNE & FLETCHER, 1995). Ein Glomerulus setzt sich aus einem Netzwerk von Kapillaren zusammen (ROSE & POST, 2001b), welches in die Bowman-Kapsel einmündet (BRAUN, 2006). Blut wird über ein zuführendes Gefäß (Vas afferens) in den Glomerulus transportiert (BRAUN, 2006; SILBERNAGEL & DESPOPOULOS, 2007). Aus dem Blut wird infolge des bestehenden hydrostatischen Druckgradienten ein Filtrat durch eine glomeruläre Membran abgepresst (WATSON, 1998). Über ein wegführendes Gefäß (Vas efferens) wird das filtrierte Blut anschließend aus den Kapillaren abtransportiert (BRAUN, 2006).

Die glomeruläre Membran besteht aus drei Schichten: Kapillarendothel, glomeruläre Basalmembran und Podozyten-Schlitzmembran (DIBARTOLA, 2000a; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Die Endothelzellen besitzen 50 bis 100 Nanometer (nm) große Poren (DIBARTOLA, 2000a; BRAUN, 2006; SILBERNAGEL & DESPOPOULOS, 2007). Diese halten zelluläre Komponenten, wie zum Beispiel (z. B.) Blutzellen zurück (DIBARTOLA, 2000a; BRAUN, 2006). Die Poren sind zu groß, um

Makromoleküle, wie Albumin mit einem Molekulargewicht von 68.000 Dalton an der Passage zu hindern (OSBORNE & FLETCHER, 1995). Die Endothelzellen sind jedoch zusätzlich mit negativ geladenen Sialoglycoproteinen bedeckt, die eine große Rolle bei der Behinderung der Passage von negativ geladenen Makromolekülen wie Albumin spielen (OSBORNE & FLETCHER, 1995; DIBARTOLA, 2000a). Deshalb können negativ geladene Proteine mit einer Größe, die das Kapillarendothel passieren könnten, trotzdem zurück gehalten werden (OSBORNE & FLETCHER, 1995).

Die glomeruläre Basalmembran ist dreischichtig angeordnet und besteht aus einer Lamina rara interna auf der endothelialen Seite, einer zentral angeordneten Lamina densa und einer Lamina rara externa auf der epithelialen Seite (DIBARTOLA, 2000a). Sowohl die Lamina rara interna als auch die Lamina rara externa enthalten polare Proteine, die zur negativ geladenen Filtrationsbarriere beitragen (DIBARTOLA, 2000a). Die Basalmembran verhindert die Passage von Teilchen mit einem Molekulargewicht von über 200.000 Dalton (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004).

Die Podozyten-Schlitzmembran ist der feinste Filter für den Durchtritt von Teilchen und es können nur Moleküle bis zu einer maximalen Größe von 65.000 Dalton passieren (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Die Schlitzporen der Podozyten enthalten ebenfalls negativ geladene Sialoglycoproteine und halten negativ geladene Stoffe zurück (DIBARTOLA, 2000a).

Kleinere Moleküle durchdringen die Filtrationsbarriere ungestört (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Dazu gehören Wasser (18 Dalton), Harnstoff (60 Dalton), Glukose (180 Dalton), Kreatinin oder Elektrolyte (BRAUN, 2006). Der sogenannte Siebungskoeffizient gibt die Filtrierbarkeit eines Moleküls an. Dabei bedeutet ein Siebungskoeffizient von 0, dass das Molekül vollständig von der Filtrationsbarriere zurückgehalten wird, während ein Siebungskoeffizient von 1 eine vollständige Filtration eines Teilchens angibt (BRAUN, 2006).

1.1.1.2. Bowman-Kapsel

Die Bowman-Kapsel, in die sich ein Glomerulus sackartig einstülpt, wird aus einer kollagenen Membran gebildet (OSBORNE & FLETCHER, 1995). Sie wirkt als ein passives Behältnis für das glomeruläre Filtrat, welches anschließend dem

Tubulussystem zugeführt wird (OSBORNE & FLETCHER, 1995). Die Passage von Teilchen durch die Bowman-Kapsel spielt im physiologischen Zustand eine quantitativ geringe Rolle, gewinnt jedoch unter pathologischen Bedingungen an Bedeutung (OSBORNE & FLETCHER, 1995).

1.1.1.3. Tubulussystem

Die Aufgabe der Tubuli ist die Verarbeitung des Endharns aus dem Primärharn durch tubuläre Resorptions- und Sekretionsvorgänge (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004).

Der Tubulus tritt an seinem Glomerulus aus, läuft in Richtung des Harnpols, es folgt die schleifenartige Umkehr, er läuft wieder in Richtung Glomerulus und touchiert diesen erneut (BRAUN, 2006). Die Stelle an dem sich der aufsteigende Tubulus und der Glomerulus berühren, wird als Macula densa bezeichnet (BRAUN, 2006). Der Tubulus mündet über ein Verbindungssegment in ein Sammelrohr (BRAUN, 2006).

Das Tubulussystem besteht aus vier Segmenten: proximaler Tubulus, Henlesche Schleife, distaler Tubulus und Sammelrohr (SUKI & NG, 1983).

Das Tubulussystem lässt sich jedoch noch weiter unterteilen (BRAUN, 2006):

- proximaler Tubulus mit Pars convoluta (proximales Konvolut) und Pars recta (absteigender dicker Teil des Schenkels der Henleschen Schleife)
- intermediärer Tubulus mit Pars descendens (absteigender dünner Teil des Schenkels der Henleschen Schleife) und Pars ascendens (aufsteigender dünner Teil des Schenkels der Henleschen Schleife)
- distaler Tubulus mit Pars recta (aufsteigender dicker Teil des Schenkels der Henleschen Schleife) und Pars convoluta (distales Konvolut)
- Sammelrohr

Als Henlesche Schleife wird der Bereich von der Pars recta bis zur Pars recta definiert (BRAUN, 2006).

1.2. Tubuläre Transportprozesse

Die Tubuli haben die Aufbereitung des Endharns aus dem Primärharn durch tubuläre Resorptions- und Sekretionsvorgänge zur Aufgabe (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004).

1.2.1. Proximaler Tubulus

Der proximale Tubulus leistet mengenmäßig mit 60 bis 80 % die größte Resorptionsleistung (SUKI & NG, 1983; OSBORNE & FLETCHER, 1995).

Die epithelialen Zellen des proximalen Tubulus sind mit Mikrovilli überzogen (OSBORNE & FLETCHER, 1995; DIBARTOLA, 2000a). Die Nieren von Katzen besitzen mehr Lipide in den epithelialen Zellen des proximalen Tubulus als die Nieren von anderen Tieren (OSBORNE & FLETCHER, 1995). In diesem Tubulusabschnitt erfolgt die Resorption von etwa zwei Dritteln des Natriumchlorids (NaCl) und des Wassers sowie ca. 90 % des Bicarbonats (HCO_3^-) aus dem Ultrafiltrat (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Es findet eine aktive Rückresorption von Natrium statt, wodurch Wasser und andere Substanzen isoosmotisch passiv folgen.

Die proximalen Tubuli sind vom durchlässigen Typ ("leaky"), was bedeutet, dass diese eine relative Permeabilität aufweisen und damit eine bedeutende Menge an Wasser und NaCl transportiert werden können (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Die Resorption erfolgt isoosmotisch aufgrund des geringen Konzentrationsgradienten (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Im proximalen Tubulus entspricht die Osmolalität deshalb größtenteils dem glomerulären Filtrat (WATSON, 1998).

Im frühen proximalen Tubulus wird Natrium aktiv aus dem Tubuluslumen transportiert (SUKI & NG, 1983; WATSON, 1998; ROSE & POST, 2001d). Durch die basolaterale Membran wird Natrium im Umtausch gegen Kalium mit Hilfe der Na^+/K^+ -ATPase aus der Tubuluszelle in Richtung Blut transportiert (KOHN & DIBARTOLA, 2000; ROSE & POST, 2001d; BRAUN, 2006; SILBERNAGEL & DESPOPOULOS, 2007). Über einen Na^+/H^+ -Antiport wird Natrium zuvor vom Tubuluslumen durch die luminale Membran im Austausch gegen ein H^+ -Ion in die proximale Tubuluszelle aufgenommen (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006; SILBERNAGEL & DESPOPOULOS, 2007). In diesem Abschnitt findet gleichzeitig auch ein Cotransport zwischen Natrium und Aminosäuren, Glukose und Phosphat über die luminale Membran statt (SUKI & NG, 1983; DIBARTOLA, 2000a). Bicarbonat wird im Tubuluslumen unter Einbeziehung von H^+ zu Kohlensäure (H_2CO_3) umgebaut (SUKI & NG, 1983; FINCO, 1995; BRAUN, 2006). Aus dieser wird mit Hilfe einer Carboanhydrase im Tubuluslumen Kohlendioxid (CO_2) gebildet,

welches ungestört durch die luminale Membran in die Tubuluszelle wandern kann (KOHN & DIBARTOLA, 2000; BRAUN, 2006). Aus CO_2 und Wasser entsteht in der Tubuluszelle erneut H_2CO_3 (FINCO, 1995). Unter Einbeziehung einer zellulären Carboanhydrase wird aus H_2CO_3 ein H^+ -Ion und HCO_3^- gebildet (SUKI & NG, 1983; FINCO, 1995; BRAUN, 2006). Sowohl die zelluläre als auch die luminale Carboanhydrase spielen somit eine wichtige Rolle bei der Resorption von Bicarbonat (SUKI & NG, 1983). Durch die basolaterale Membran wird HCO_3^- über einen Na^+ - HCO_3^- -Cotransporter aus der Zelle ausgeschleust und der Blutbahn zugeführt (FINCO, 1995; BRAUN, 2006). Das entstandene H^+ -Ion wird in das Tubuluslumen transportiert und mit dem Urin ausgeschieden (FINCO, 1995). Bicarbonat verursacht einen chemischen Gradienten, wodurch Teilchen wie Natrium und Chlorid durch sogenannten Solvent drag mitgerissen werden (SUKI & NG, 1983; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004).

1.2.2. Henlesche Schleife

Rund 40 bis 45 % des Primärharns, welches nicht im proximalen Tubulus reabsorbiert wird, erreicht die Henlesche Schleife (ROSE & POST, 2001f).

Im dicken absteigenden Schenkel findet aktiver Transport von NaCl durch die basolaterale Membran über eine Na^+/K^+ -ATPase statt (PRADELLA et al., 1988; DIBARTOLA, 2000a; ROSE & POST, 2001f; BRAUN, 2006). Im Austausch werden positive geladene Kalium-Ionen in die Tubuluszelle eingeschleust (BRAUN, 2006). Im dünnen absteigenden Schenkel besteht eine hohe Permeabilität für Wasser und eine niedrige Permeabilität für Natrium (SUKI & NG, 1983). Der dünne aufsteigende Schenkel ist hoch permeabel für Natrium, jedoch undurchlässig für Wasser (SUKI & NG, 1983). Der dicke aufsteigende Schenkel ist ebenfalls wasserimpermeabel (SUKI & NG, 1983; LESLIE, 1986; BRAUN, 2006). Durch die Resorption von Elektrolyten sinkt die Osmolalität des Filtrats bei Durchlauf durch dieses Tubulussegment auf etwa 100 Milliosmol pro Kilogramm (mOsm/kg) (LESLIE, 1986; DIBARTOLA, 2000a; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Aufgrund dieser Tatsache wird der dicke aufsteigende Schenkel Verdünnungssegment genannt (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Im dicken aufsteigenden Schenkel findet die Resorption von 25-30 % des gefilterten Natriums und Chlorids statt (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). In diesem Bereich erfolgt die aktive Resorption von Natrium, Kalium und zwei Chlorid-Ionen aus

dem Tubuluslumen mit Hilfe eines $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC2), welcher sich in der luminalen Membran befindet (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006; SILBERNAGEL & DESPOPOULOS, 2007). Auch in diesem Bereich findet ein Abtransport des resorbierten Natriums über eine $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ in der basolateralen Membran statt (ROSE & POST, 2001f; BRAUN, 2006). Negativ geladene Chlorid-Ionen wiederum werden über Chlorid-Kanäle aus der Zelle ausgeschleust (ROSE & POST, 2001f; BRAUN, 2006). Positiv geladene Kalium-Ionen werden gleichzeitig in die Tubuluszelle eingeschleust (BRAUN, 2006). Durch diesen Austausch entsteht ein elektrischer Gradient, wodurch wiederum eine Resorption von Natrium, Calcium und Magnesium stattfindet (SUKI & NG, 1983).

1.2.3. Distaler Tubulus

Die Osmolalität im distalen Tubulus beträgt etwa 100 mOsm/kg (WATSON, 1998; DIBARTOLA, 2000a).

Im frühen distalen Tubulus findet eine Resorption von ca. 10 % des gefilterten NaCl sowie lediglich eines kleinen Teiles Wasser statt (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). In der luminalen Membran befindet sich ein NaCl-Cotransporter über welchen Natrium- und Chlorid-Ionen in die Tubuluszelle gelangen (ROSE & POST, 2001e; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Eine $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ in der basolateralen Membran schleust die in der Tubulusflüssigkeit befindlichen Natrium-Ionen aus der Zelle in Richtung Blutbahn (ROSE & POST, 2001e; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Die Chlorid-Ionen werden wiederum durch die basolaterale Membran über Chlorid-Kanäle aus der Tubuluszelle transportiert (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004).

Die Prozesse, die im spätdistalen Tubulus stattfinden, werden durch mehrere Hormone gesteuert (BRAUN, 2006). So werden epitheliale Natrium-Kanäle (ENaC) in die luminale Membran durch die Anwesenheit von Aldosteron eingelagert (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Durch diese Kanäle werden vermehrt Natrium-Ionen in die Tubuluszelle transportiert (BRAUN, 2006). Weiterhin stimuliert Aldosteron den Einbau einer $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ in die basolaterale Membran, wodurch Natrium aktiv aus der Zelle in Richtung Blutbahn befördert wird (BRAUN, 2006). Die luminale Membran ist

permeabel für Kalium, aber wenig permeabel für Chlorid (SUKI & NG, 1983). Die Resorption von Natrium resultiert in einem elektrischen Gradienten (SUKI & NG, 1983). Dadurch werden Kalium-Ionen passiv in die Tubulusflüssigkeit transportiert (SUKI & NG, 1983; BRAUN, 2006).

Im distalen Tubulus wird aufgrund der geringen Permeabilität nur eine kleine Menge Wasser resorbiert (ROSE & POST, 2001e). Der distale Tubulus ist nur wenig empfänglich für das antidiuretische Hormon (ADH) und spielt deshalb keine wichtige Rolle bei der Harnkonzentrierung (SUKI & NG, 1983; ROSE & POST, 2001e).

1.2.4. Sammelrohr

Die Pars convoluta des distalen Tubulus mündet über ein Verbindungsstück in ein Sammelrohr (OSBORNE & FLETCHER, 1995). Etwa zehn Nephronen gehen in jeweils ein Sammelrohr über (MARSH, 1983; BRAUN, 2006). Man unterscheidet zwischen den mitochondrienärmeren “hellen“ Hauptzellen und den mitochondrienreicheren “dunklen“ Schaltzellen (intercalated cells) (OSBORNE & FLETCHER, 1995; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004).

Im Sammelrohr wird Natrium über epitheliale Natrium-Kanäle (ENaC) resorbiert (BRAUN, 2006). Aldosteron induziert den Einbau dieser Kanäle in die luminale Membran (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Wird Aldosteron in hohem Maße freigesetzt, kommt es zur passiven Kaliumsekretion (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Die Anwesenheit von ADH steigert die Wasserpermeabilität, wodurch Wasser passiv in das Interstitium einströmt und die Urinkonzentration steigt (SUKI & NG, 1983).

1.3. Physiologische Vorgänge bei der Harnkonzentrierung

Bei maximalem Wassermangel kann eine Konzentrierung des Harnes je nach Tierart bis auf das 4- bis 12-fache der Plasmaosmolarität erfolgen (1400 Milliosmol pro Liter (mOsm/l)) (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Diesen Vorgang bezeichnet man als Antidiurese. Die Plasmaosmolarität beziehungsweise (bzw.) Plasmaosmolarität beträgt normalerweise etwa 270 bis 285 mOsm/kg (LESLIE, 1986; MORITZ, 2013) bzw. 290 mOsm/l (BRAUN, 2006). Bei maximaler Diurese sinkt die Osmolarität des Urins beim Menschen bis auf 50 mOsm/l (BRAUN, 2006; SILBERNAGEL & DESPOPOULOS, 2007).

Im Folgenden werden die vier Mechanismen, die an der Harnkonzentrierung beteiligt sind beschrieben.

1.3.1. Harnkonzentrierung in der Henleschen Schleife

Der aufsteigende Schenkel der Henleschen Schleife ist vollständig wasserimpermeabel (LESLIE, 1986; DIBARTOLA, 2000a; ROSE & POST, 2001f; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Elektrolyte wie NaCl werden jedoch resorbiert (ROSE & POST, 2001f; BRAUN, 2006).

Es herrscht zunächst als Ausgangssituation in der gesamten Henleschen Schleife eine Osmolalität von 300 mOsm/kg (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). NaCl wird aktiv aus dem aufsteigenden Schenkel resorbiert (DIBARTOLA, 2000a). Aufgrund der Wasserundurchlässigkeit ist Wasser jedoch nicht in der Lage nachzufließen (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Dadurch entsteht ein osmotischer Gradient (LESLIE, 1986). Im aufsteigenden Schenkel sinkt die Osmolalität aus diesem Grund von 300 mOsm/kg um 100 mOsm/kg auf 200 mOsm/kg (DIBARTOLA, 2000a; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Die Osmolalität im Interstitium steigt hingegen auf etwa 485 mOsm/kg (ROSE & POST, 2001f). Somit wird das Interstitium hyperosmotisch (ROSE & POST, 2001f), das Lumen hypoosmotisch (PRADELLA et al., 1988). Die Steigerung der Tonizität im Interstitium hat zur Folge, dass Wasser aus dem absteigenden Schenkel in das Interstitium gelangt (LESLIE, 1986; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Die Osmolalität im absteigenden Schenkel steigt von 300 auf 400 mOsm/kg (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Die oben erklärten Schritte wiederholen sich bis zum oberen Ende der Henleschen Schleife mit immer höher steigenden Osmolalitäten (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Bis zum Umkehrpunkt der Henleschen Schleife steigt die Tonizität des Urins (BRAUN, 2006). Dieses Verfahren wird als Prinzip der Gegenstromkonzentrierung bezeichnet (BRAUN, 2006). Je länger die Henlesche Schleife, desto stärker die Konzentrationsfähigkeit (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004).

1.3.2. ADH-regulierte Wasserresorption

Die Osmolalität des Harns, der den aufsteigenden Schenkel verlässt, ist deutlich geringer als die des Blutplasmas und beträgt etwa 100 mOsm/kg (LESLIE, 1986; PRADELLA et al., 1988; DIBARTOLA, 2000a; VON ENGELHARDT &

BREVES, 2004). Die Konzentrierung des Harnes findet im späten distalen Tubulus sowie im Sammelrohr über eine ADH-regulierte Wasserresorption statt (BRAUN, 2006). ADH wird von Neuronen im Nucleus paraventricularis und Nucleus supraopticus des Hypothalamus gebildet (PRADELLA et al., 1988; FINCO, 1995; LORD, 1999). Bei Bedarf erfolgt die Freisetzung aus dem Hypophysenhinterlappen (BRAUN, 2006). Die Ausschüttung von ADH wird über Osmorezeptoren des Hypothalamus sowie Osmorezeptoren im Pfortaderbereich reguliert (FINCO, 1995; BRAUN, 2006). Diese reagieren bereits auf Veränderungen der Plasmaosmolalität von etwa 2 % (PRADELLA et al., 1988; FINCO, 1995; SILBERNAGEL & DESPOPOULOS, 2007). Auch Barorezeptoren im Bereich des rechten Atriums, der Arteria carotis sowie der Lungengefäße haben Einfluss auf die ADH-Ausschüttung (BRAUN, 2006).

ADH bindet an Rezeptoren der basolateralen Membran der Sammelrohrepithelzellen (LESLIE, 1986; PRADELLA et al., 1988; LORD, 1999). Daraufhin wird das Enzym Adenylatcyclase aktiviert, welches die Bildung von intrazellulärem cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert (LESLIE, 1986). Durch Stimulation von cAMP wird das wasserdurchlässige Glycoprotein Aquaporin 2 gebildet (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Dieses wird in intrazellulären Vesikeln gespeichert und in Abhängigkeit von ADH in die wasserundurchlässige luminale Membran eingebaut (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Durch diesen Vorgang wird die luminale Membran wasserpermeabel (FINCO, 1995). Aus diesem Grund steigt die Wasserresorption, die Tonizität der Tubulusflüssigkeit und wiederum auch die Konzentration des Harnes (BRAUN, 2006). Demgegenüber wird mit rückläufiger ADH-Ausschüttung Aquaporin 2 aus der luminalen Membran abtransportiert, wodurch die Wasserundurchlässigkeit des Sammelrohrs steigt (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Die Wasserpermeabilität des Epithels des Sammelrohrs hängt somit von der ADH-Präsenz ab (DIBARTOLA, 2000a).

Bei Dehydratation, steigt die Osmolalität des Blutes (BRAUN, 2006). Dadurch wird mehr ADH freigesetzt, wodurch die Wasserpermeabilität des späten distalen Tubulus und Sammelrohrs steigt und Wasser aus dem Lumen ins Interstitium transportiert wird (DIBARTOLA, 2000a; ROSE & POST, 2001f; BRAUN, 2006). Die Flüssigkeit im Sammelrohr steht im osmotischem Gleichgewicht mit dem

Interstitium (LESLIE, 1986; DIBARTOLA, 2000a; ROSE & POST, 2001f). Es wird somit bei hohen ADH-Konzentrationen ein konzentrierter Urin ausgeschieden (ROSE & POST, 2001f). Dieser Mechanismus wird auch Antidiurese genannt (BRAUN, 2006).

Bei Hyperhydratation, sinkt die Osmolalität des Blutes. Die ADH-Freisetzung wird vermindert, weshalb das Sammelrohr wasserimpermeabel ist (WATSON, 1998; DIBARTOLA, 2000a). Die Tubulusflüssigkeit, die die Henlesche Schleife verlässt, ist hypoosmolal und bleibt hypoosmolal, da aufgrund des fehlenden ADH keine Aquaporine in die Membran eingebaut werden und Wasser nicht zurück ins Interstitium gelangen kann (LESLIE, 1986). Dieser Zustand heißt Wasserdiurese (BRAUN, 2006).

1.3.3. Gegenstromprinzip der Vasa recta

Die Vasa recta sind ein zweites Gegenstromsystem und haben eine ähnliche Schleifenkonfiguration wie die Henlesche Schleife (ROSE & POST, 2001f; BRAUN, 2006).

Im absteigenden Gefäß gelangen gelöste Teilchen aus dem Interstitium in das Gefäß (ROSE & POST, 2001f; BRAUN, 2006). Die Osmolalität des Blutes steigt, da Wasser wiederum das Gefäß verlässt (FINCO, 1995; BRAUN, 2006). Es herrscht ein osmotischer Gradient (ROSE & POST, 2001f). Im aufsteigenden Gefäß gelangen die gelösten Teilchen zurück in das Interstitium, wohingegen Wasser in das Gefäß zurückdiffundiert (DIBARTOLA, 2000a; BRAUN, 2006). Dies führt zu einer Verminderung der Osmolalität des Blutes dieser Gefäße (FINCO, 1995). Dieser Mechanismus führt zu einer Zurückhaltung von osmotisch wirksamen Teilchen im Interstitium, wodurch der osmotische Gradient in der Nierenmark aufrechterhalten wird und die Harnkonzentration steigt (ROSE & POST, 2001f; BRAUN, 2006).

1.3.4. Harnstoffkreislauf

Der dünne aufsteigende Schenkel der Henleschen Schleife und das kortikale Sammelrohr sind in Gegenwart von ADH wasserpermeabel, jedoch impermeabel für Harnstoff (FINCO, 1995; DIBARTOLA, 2000a; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004; BRAUN, 2006). Es findet eine Wasserresorption statt, allerdings keine Resorption von Harnstoff (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Die Harnstoffkonzentration des Filtrates in diesem Bereich steigt zunehmend

(DIBARTOLA, 2000a; VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Das Sammelrohr enthält einen ADH-regulierten Uniporter-Carrier für Harnstoff (UT1) in der luminalen Membran (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). In Gegenwart von ADH diffundiert Harnstoff aus dem Lumen des Sammelrohrs in das medulläre Interstitium (SUKI & NG, 1983; FINCO, 1995). Vom Interstitium aus wird Harnstoff in den dünnen aufsteigenden und absteigenden Schenkel der Henleschen Schleife aufgenommen und über den distalen Tubulus zurück zum Sammelrohr transportiert (BRAUN, 2006). Diese Rezirkulation erfolgt durch einen zweiten Transporter (UT2) (VON ENGELHARDT & BREVES, 2004). Durch diesen Vorgang kann die Harnstoffkonzentration im frühen distalen Tubulus konstant hoch aufrechterhalten werden (ROSE & POST, 2001f). Wasser wird aus dem dünnen absteigenden Teil der Henleschen Schleife ausgeschieden und die Konzentration steigt (ROSE & POST, 2001f).

2. Parameter zur Beurteilung der Harnkonzentrierung

Die Messung der Urinkonzentration ist ein wesentlicher Bestandteil der Urinuntersuchung und gibt wichtige Informationen über die Nierenfunktion (CHADHA et al., 2001; SMART et al., 2009). Der Goldstandard zur Beurteilung der Nierenkonzentrierung ist die Osmolalität (SOUZA et al., 2015). In der Praxis wird jedoch die Messung des USG als Schätzung der Osmolalität bestimmt (IMRAN et al., 2010).

2.1. Urinspezifisches Gewicht

Die Bestimmung des USG wird als wichtiger Bestandteil zur Beurteilung der renalen Konzentrationsfähigkeit bei Hunden und Katzen angesehen (BENNETT et al., 2011). Das USG stellt außerdem eine zuverlässige Bestimmungsmethode zur Beurteilung des Flüssigkeitshaushaltes eines Patienten dar (SIMERVILLE et al., 2005).

2.1.1. Definition

Das USG wird definiert als das Verhältnis des Gewichtes eines Volumens einer Flüssigkeit zum Gewicht eines gleichwertigen Volumens von destilliertem Wasser (JAMISON & ROBERTSON, 1982; GOUNDEN & NEWALL, 1983; WATSON, 1998; DIBARTOLA, 2000b; ROSE & POST, 2001c; REINE & LANGSTON, 2005; GRAUER, 2016). Somit ist dieses das Verhältnis des Gewichtes von Urin

zum Gewicht eines gleichwertigen Volumens von Wasser (OSBORNE et al., 1995; MORITZ, 2013).

Urinspezifisches Gewicht = Gewicht von Urin/Gewicht von Wasser

Es bezieht sich demnach auf die Dichte (Masse pro Volumen) einer Probe verglichen mit destilliertem Wasser (CHADHA et al., 2001; MORITZ, 2013). Das spezifische Gewicht von Wasser beträgt unter Standardbedingungen hinsichtlich Temperatur und Druck 1.000 (OSBORNE et al., 1995; NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Urin besitzt aufgrund der darin gelösten Stoffe eine größere Dichte als Wasser (MORITZ, 2013; NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Das USG hängt nicht nur von der Anzahl der im Urin gelösten Teilchen ab, sondern auch von deren Größe und Molekulargewicht (DIBARTOLA, 2000b; MILLER et al., 2004; REINE & LANGSTON, 2005; SESHIA & DICKINSON, 2020).

2.1.1.1. Refraktion

Ein physikalisches Merkmal stellt die Refraktion (n) dar. Dabei handelt es sich um eine Konstante bezogen auf das Verhältnis der Geschwindigkeit von Licht in einem Vakuum zu der Geschwindigkeit von Licht in einem bestimmten Medium (GEORGE, 2001). Die Refraktion von Licht, welches zwei Medien passiert, unterliegt Snells Gesetz (PRADELLA et al., 1988; GEORGE, 2001). Dieses beschreibt die Beziehung zwischen dem Einfallswinkel (θ_i) und dem Winkel des gebrochenen Strahls (θ_r) (GEORGE, 2001).

$$n = \sin \theta_i / \sin \theta_r$$

n = Refraktion

θ_i = Einfallswinkel

θ_r = Winkel des gebrochenen Strahls

Die Refraktion einer wässrigen Lösung wird durch verschiedene Faktoren, wie die Lösung selbst, ihre Konzentration und die Temperatur bestimmt. Jede Lösung besitzt eine charakteristische Refraktion n pro Konzentration in Gramm pro Deziliter (g/dl), was als spezifische Refraktivität bezeichnet wird (GEORGE, 2001). Die Refraktion eines Vakuums liegt bei $n = 1$ (GEORGE, 2001). Gas besitzt eine Refraktion nahe bei $n = 1$ (GEORGE, 2001). Der Grad der Refraktion ist proportional zur Anzahl und Art der Partikel, die im Urin gelöst sind

(CHADHA et al., 2001). Die Refraktion kann sehr präzise durch ein Refraktometer des Goldberg-Typs bestimmt werden (WOLF, 1962).

2.1.1.2. Refraktiver Index/Refraktivität

Der refraktive Index ist das Verhältnis der Geschwindigkeit von Licht in der Luft zur Geschwindigkeit von Licht in einer Lösung, in diesem Fall in Urin (OSBORNE et al., 1995; CHADHA et al., 2001; ESHAR et al., 2012). Unterschiedliche Lösungen, wie Urin, enthalten Substanzen, die verschiedene Wellenlängen des Lichtes absorbieren und folglich Lichtstrahlen biegen (OSBORNE et al., 1995). Der Grad der Biegung kann durch ein Refraktometer gemessen werden (OSBORNE et al., 1995). Wie das USG, ist der refraktive Index von der Quantität und der Charakteristik der vorhandenen Teilchen abhängig (OSBORNE et al., 1995).

2.1.2. Einteilung des urinspezifischen Gewichtes

Das USG von gesunden Hunden und Katzen ist sehr variabel und abhängig von der Wasser- und Elektrolytbalance des Körpers sowie der Zusammensetzung der Ernährung (OSBORNE et al., 1995). Das USG schwankt häufig von Tag zu Tag oder innerhalb desselben Tags (OSBORNE et al., 1995; VAN VONDEREN et al., 1997). Ein niedriges USG einer Urinprobe schließt somit nicht aus, ein hohes USG in einer anderen Probe des gleichen Probanden zu finden (VAN VONDEREN et al., 1997). Das USG kann bei gesunden adulten Hunden von 1.001 bis 1.065 und bei gesunden adulten Katzen von 1.001 bis 1.080 reichen (OSBORNE et al., 1995; MORITZ, 2013).

2.1.2.1. Hyposthenurie

Bei einer Hyposthenurie liegt ein USG von unter 1.008 vor (WATSON, 1998; REINE & LANGSTON, 2005; MORITZ, 2013; STEINBACH et al., 2017; SCHWENDENWEIN, 2019). Dies bedeutet, dass die Osmolalität des Urins niedriger als die Osmolalität des Plasmas ist (DIBARTOLA, 2000b; REINE & LANGSTON, 2005). Die Bildung eines verdünnten Urins mit einem USG von unter 1.008 setzt voraus, dass das distale Tubuluskonvolut intakt ist (WATSON, 1998; REINE & LANGSTON, 2005). Trotzdem kann eine renale Erkrankung mit einem Verlust von bis zu Zweidrittel der Nephronen vorliegen (WATSON, 1998). Die Bildung eines hyposthenurischen Urins kann eine Abnormalität darstellen, die mit verschiedenen Krankheiten einhergeht, wie z. B. zentraler oder renaler

Diabetes insipidus, Hyperadrenokortizismus oder Hypercalcämie (REINE & LANGSTON, 2005; WILLARD & TVEDTEN, 2006b). Ein hyposthenurischer Urin kann auch bei psychogener Polydipsie vorliegen (WATSON, 1998; REINE & LANGSTON, 2005).

2.1.2.2. Isosthenurie

Eine Isosthenurie liegt bei einem USG von 1.008 bis 1.012 vor (WATSON, 1998; REINE & LANGSTON, 2005; GRAUER, 2016; STEINBACH et al., 2017; SCHWENDENWEIN, 2019; STEINBACH et al., 2019). Somit liegt eine Osmolalität des Urins vor, die der physiologischen Osmolalität von Plasma entspricht (DIBARTOLA, 2000b; REINE & LANGSTON, 2005). Beim Vorliegen einer Isosthenurie in Kombination mit Dehydration und/oder Azotämie sollte eine primäre Nierenerkrankung in Betracht gezogen werden (WATSON, 1998). Auch bei Patienten mit anderen Gründen für eine Polydipsie oder Polyurie, wie z. B. Cushing oder Diabetes mellitus kann ein isosthenurischer Urin vorliegen (BROBST, 1989). Bei Vorliegen einer persistierenden Isosthenurie sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden (WATSON, 1998).

2.1.2.3. Inadäquat konzentrierter Urin

Bei einem USG von 1.013 bis 1.029 beim Hund und 1.013 bis 1.034 bei der Katze spricht man bei gleichzeitigem Vorliegen einer Dehydratation von einem inadäquat konzentriertem Urin (WATSON, 1998). Bei gleichzeitigem Vorkommen einer Azotämie spricht dies für das Vorliegen einer Nierenerkrankung (OSBORNE et al., 1995).

2.1.2.4. Hypersthenurie

Eine Hypersthenurie liegt vor, wenn die Osmolalität des Urins größer als die des Plasmas ist (DIBARTOLA, 2000b). Die Ausscheidung eines konzentrierten Urins mit einem USG von über 1.030 bei Hunden und 1.035 bei Katzen weist darauf hin, dass aktive tubuläre Resorptionsprozesse stattfinden (WATSON, 1998). Klinische Untersuchungen von Hunden ergaben, dass ein USG von 1.030 oder höher ein adäquates Vorhandensein von Nephronen voraussetzt (OSBORNE et al., 1995). Trotzdem kann eine Nierenerkrankung mit dem Verlust von Zweidritteln der Nephronen vorhanden sein (WATSON, 1998). Einige Katzen mit Nierenschädigung sind sogar in der Lage einen Urin mit einem USG von 1.040 bis 1.045 zu produzieren (IRIS, 2019).

2.2. Osmolalität

Die Bestimmung der Osmolalität von Urin ist das Verfahren mit der größten Spezifität zur Beurteilung der Nierenkonzentrierungsfähigkeit (CHADHA et al., 2001). Die Messung der Osmolalität wird deshalb als Goldstandard bezeichnet. (CHADHA et al., 2001). Die Osmolalität wird durch die Anzahl aller gelösten Teilchen im Urin bestimmt (MORITZ, 2013). Sie ist im Gegensatz zum USG nicht vom Molekulargewicht oder der chemischen Zusammensetzung abhängig (WATSON, 1998).

2.2.1. Definition

Die Osmolalität entspricht der Gesamtkonzentration aller osmotischer Teilchen in einer Lösung pro Gewichtseinheit der Lösung (WATSON, 1998; SILBERNAGEL & DESPOPOULOS, 2007). Die Einheit ist mOsm/kg (OSBORNE et al., 1995; BARR & PESILLO-CROSBY, 2008; GUERRERO et al., 2017). Die Osmolarität entspricht der Gesamtkonzentration aller osmotischer Teilchen in einer Lösung pro Volumeneinheit der Lösung (WATSON, 1998; SILBERNAGEL & DESPOPOULOS, 2007). Die Einheit beträgt mOsm/l (OSBORNE et al., 1995; BARR & PESILLO-CROSBY, 2008; GUERRERO et al., 2017).

2.2.1.1. Osmotische Lücke

Die Berechnung der Osmolarität des Plasmas wird in der Veterinärmedizin häufig durchgeführt (KOHN & DIBARTOLA, 2000). Es gibt sehr viele verschiedene Gleichungen für diese Berechnung (DORWART & CHALMERS, 1975; WEISBERG, 1975; WORTHLEY et al., 1987; HOFFMAN, 1994; OSYPIW et al., 1997). Die in der klinischen Praxis am einfachsten zu verwendete Gleichung ist folgende:

Berechnete Osmolarität bzw. Osmolalität (mOsm/l bzw. mOsm/kg) = $2 (\text{Na}^+ + \text{K}^+) + \text{Harnstoff} + \text{Glukose}$ (Millimol pro Liter (mmol/l)) (WATSON, 1998; LORD, 1999)

Die Notwendigkeit der Ableitung einer berechneten Osmolarität basiert auf dem Konzept der osmotischen Lücke (KRUSE & CADNAPAPHORNCHAI, 1994).

Osmotische Lücke = Gemessene Osmolalität – Berechnete Osmolarität (OSYPIW et al., 1997; LORD, 1999; WILLARD & TVEDTEN, 2006a).

Bei Verwendung der oben genannten Gleichung entspricht die osmotische Lücke weniger als zwei Einheiten (LORD, 1999). Eine höhere Lücke würde bedeuten, dass in der Probe ein weiteres Molekül vorhanden ist, welches nicht gemessen wird, aber zu einer wesentlichen Änderung des osmotischen Druckes führt (BARR & PESILLO-CROSBY, 2008). Die Entdeckung einer osmotischen Lücke spielt in der Toxikologie eine wichtige Rolle, um Substanzen mit einem niedrigen Molekulargewicht im Plasma zu identifizieren (LORD, 1999). Solche Substanzen sind z. B. Ethanol, Methanol, Ethylenglykol oder Mannitol (CHAMPION et al., 1975; GARCIA-MORALES et al., 2004; WILLARD & TVEDTEN, 2006a).

2.2.2. Einteilung der Osmolalität

Die Osmolalität des Urins reicht bei Hunden von 50 bis über 2700 mOsm/kg und bei Katzen von 50 bis über 3200 mOsm/kg (OSBORNE et al., 1995). Bei gesunden Hunden konnten intra- und interindividuelle Schwankungen der Osmolalität von 161 bis 2830 mOsm/kg beschrieben werden (VAN VONDEREN et al., 1997). Die tageszeitlichen Schwankungen können auf das Trinkverhalten zurückgeführt werden, das im Zusammenhang mit der Aktivität der Tiere steht. Die Wasseraufnahme ist bei aktiven Hunden größer als bei weniger aktiven Hunden (O'CONNOR, 1975; GOLOB et al., 1977).

Die Osmolalität des Urins kann anhand des USG geschätzt werden und es wurden mehrere Formeln zur Ermittlung der Osmolalität aus dem USG vorgeschlagen. So kann die Osmolalität geschätzt werden, indem die letzten beiden Stellen des USG mit 35 bis 40 multipliziert werden (MILLER, 1983; ROSE & POST, 2001c). Messungen des urinspezifischen Gewichtes von 1.001 und 1.030 entsprechen einer Osmolalität von 40 und 1200 mOsm/kg (CHADHA et al., 2001). Ein USG von 1.010 entspricht einer Osmolalität von 300 bis 350 mOsm/kg (ROSE & POST, 2001c).

2.3. Korrelation zwischen urinspezifischem Gewicht und Osmolalität

Die Korrelation zwischen zwei Messgrößen beschreibt die Assoziation zwischen diesen beiden Größen (ALTMAN & BLAND, 1983; BLAND & ALTMAN, 1986). Die meisten Studien, die die Korrelation zwischen USG und Osmolalität untersuchten, ermittelten eine gute bis exzellente Korrelation zwischen diesen, wenn das USG mittels Refraktometer gemessen wurde. So zeigte eine Studie, die die Korrelation zwischen refraktometrisch bestimmten USG und Osmolalität bei

Katzenurinproben untersuchte, eine gute Korrelation ($r = 0,967$ und $r = 0,960$) (BENNETT et al., 2011). Eine gute Korrelation zwischen refraktometrisch gemessenem USG und Osmolalität konnte auch in einer humanmedizinischen Studie gezeigt werden ($r = 0,938$) (DORIZZI et al., 1987). Wird das USG mittels Teststreifen bestimmt und mit der Osmolalität verglichen, ergibt sich eine niedrigere Korrelation. So verglich eine Studie die Korrelation zwischen refraktometrisch, kolorimetrisch (mittels Teststreifen) und hydrometrisch bestimmtem USG und der Osmolalität (COSTA et al., 2010). Es ergab sich eine gute Korrelation zwischen refraktometrisch gemessenem USG und Osmolalität ($r = 0,81$) sowie zwischen dem hydrometrisch bestimmtem USG und Osmolalität ($r = 0,86$). Die Korrelation zwischen kolorimetrisch ermitteltem USG und Osmolalität war deutlich geringer ($r = 0,46$). Weitere Studien zeigten ebenfalls eine niedrige Korrelation zwischen mittels Teststreifen bestimmtem USG und Osmolalität (GOUYON & HOUCHAN, 1993; DE BUYS ROESSINGH et al., 2001; DOSSIN et al., 2003).

Einige Autoren sind der Meinung, dass eine gute Korrelation zwischen USG und Osmolalität nur bei Urinproben besteht, die kein Protein und keine Glukose enthalten (WOLF & PILLAY, 1969; GAULT et al., 1984; LEECH & PENNEY, 1987). Allerdings wurde in einigen Studien, die den Einfluss von Protein und Glukose auf die Korrelation zwischen refraktometrisch bestimmtem USG und Osmolalität untersuchten, kein signifikanter Einfluss von Protein oder Glukose (BENITEZ et al., 1986; AYOUB et al., 2013) festgestellt. IMRAN und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss von Protein und Glukose auf die Beziehung zwischen refraktometrisch bestimmten USG und Osmolalität sowie zwischen kolorimetrisch gemessenem USG und Osmolalität (IMRAN et al., 2010). Dabei zeigte sich kein nennenswerter Einfluss von Protein und Glukose auf die Korrelation zwischen refraktometrisch bestimmtem USG und der Osmolalität. Jedoch beeinflusste Protein und Glukose die Korrelation zwischen kolorimetrisch bestimmtem USG und Osmolalität.

3. Methoden zur Messung der Harnkonzentrierung

Bereits lange vor den Untersuchungstechniken der modernen Medizin, wurden Urinuntersuchungen durchgeführt, um Hinweise auf bestimmte Krankheiten zu erhalten (CHADHA et al., 2001). Die physische Untersuchung wird als

unvollständig ohne die Untersuchung des Urins angesehen (CHADHA et al., 2001). Die Messung der Urinkonzentration ist ein wichtiger Bestandteil der Urinuntersuchung und gibt wichtige Informationen über die Nierenkonzentrierungsfähigkeit (CHADHA et al., 2001).

3.1. Messung des urinspezifischen Gewichtes

Die Bestimmung des USG erfolgt zur Beurteilung der Nierenfunktion (MILES et al., 1954; RISHNIW & BICALHO, 2015). Das USG beim gesunden Tier kann stark variieren (VAN VONDEREN et al., 1997) und wird bestimmt vom Wasser- und Elektrolythaushalt des Körpers (CARRIERI et al., 2001).

Das USG kann entweder durch direkte oder indirekte Methoden bestimmt werden (CHADHA et al., 2001).

3.1.1. Indirekte Methoden zur Messung des urinspezifischen Gewichtes

Das USG kann indirekt entweder durch die Veränderung des refraktiven Index mittels Refraktometer oder durch Veränderung des pH-Wertes eines Polyelektrolyts mittels Teststreifen bestimmt werden (CHADHA et al., 2001).

3.1.1.1. Refraktometer

In der klinischen Praxis wird das urinspezifische Gewicht am häufigsten mittels Refraktometer bestimmt (BENNETT et al., 2011; PARIS et al., 2012; BROCK et al., 2013). Obwohl die Bestimmung der Osmolalität als Goldstandard zur Evaluierung der Konzentrierungsfähigkeit der Niere betrachtet wird, hat die Messung mittels Refraktometrie diese aufgrund der geringen notwendigen Probenmenge, der kurzen Analysezeit und der relativ geringen Kosten verdrängt (WOLF & PILLAY, 1969; DORIZZI et al., 1987). Seit den 1960er Jahren sind temperaturkompensierte Refraktometer erhältlich, welche als Refraktometer des Goldberg-Typs bezeichnet werden (OSBORNE et al., 1995; GEORGE, 2001). Diese Refraktometer liefern reproduzierbare und akkurate Ergebnisse (PRADELLA et al., 1988). Mittlerweile sind ebenso digitale Refraktometer verwendbar, welche verglichen mit den bisherigen optischen Refraktometern ebenfalls zuverlässige Ergebnisse liefern (MINTON et al., 2015; WYNESS et al., 2016).

Es werden einige Tropfen der Probe auf die saubere Glasplatte (Prisma) aufgetragen, anschließend die Klappe geschlossen und das Refraktometer gegen

eine Lichtquelle gehalten (SCHWENDENWEIN, 2019). Das Prinzip des Refraktometers besteht darin, die Menge Licht zu analysieren, die einen Tropfen Urin auf der Glasplatte des Refraktometers durchdringt (BARTON & HOLMES, 1998). Flüssige Lösungen wie Urin enthalten Substanzen, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen absorbieren (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Refraktometrie basiert auf der Refraktion und kann durch nichtionische Substanzen beeinflusst werden (KO et al., 2015). Wenn Licht von einem Medium auf ein zweites Medium trifft, dann entsteht dabei ein kritischer Winkel (CHADHA et al., 2001). Die Möglichkeit einer Substanz, dabei Licht zu brechen wird als Refraktion bezeichnet (KO et al., 2015). Der kritische Winkel stellt den maximal möglichen Winkel dar, an welchem Strahlung das zweite Medium erreichen kann und gebrochen wird (CHADHA et al., 2001). Wenn eine Projektionsfläche vor den gebrochenen Strahlen angebracht wird, dann entsteht eine Demarkationslinie, welche am Refraktometer als USG abgelesen werden kann (CHADHA et al., 2001).

Die Skala der Refraktometer basiert auf experimentellen Daten, die durch Untersuchungen am Urin von Menschen gewonnen wurden. In einer Studie wurde der Urin von Menschen, Hunden und Katzen verglichen (RUBINI & WOLF, 1957). Alle Katzenurinproben hatten ein höheres USG als die Menschen- und Hundeurinproben (RUBINI & WOLF, 1957). Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf die Zusammensetzung der gelösten Substanzen des Urins der verschiedenen Spezies zurückzuführen. Aufgrund dieser Unterschiede wurden Spezies-spezifische Skalen für das USG für Säugetiere wie Katzen oder Meerschweinchen entwickelt (RUBINI & WOLF, 1957; GEORGE, 2001). Ebenso wurden Umrechnungsformeln vorgeschlagen, um das USG von felinem Urin, das mit Refraktometern für humanen und caninen Urin gemessen wurde, umzurechnen (RUBINI & WOLF, 1957). Seit einigen Jahren sind Refraktometer mit separaten Skalen für Hunde und Katzen auf dem veterinärmedizinischen Markt erhältlich.

3.1.1.2. Teststreifen

Teststreifen zur Messung des urinspezifischen Gewichtes sind seit den frühen 1980er Jahren erhältlich (CHADHA et al., 2001). Die Teststreifen wurden aufgrund der Einfachheit in der Handhabung und der geringen Kosten angewendet (CHADHA et al., 2001). Ebenfalls sind die Teststreifen in der Handhabung für

Patienten in der Humanmedizin mit Nierensteinen einfach anwendbar, um ihre Urinproduktion zu kontrollieren (KHORAMI et al., 2012). Zudem wird nur eine kleine Menge an Urin für die Messung mittels Teststreifen benötigt (FREW et al., 1982).

Die Methode basiert auf Veränderungen eines Polyelektrolytes in der Lösung, wenn sich die Ionen in der Umgebung ändern (BURKHARDT et al., 1982). Der Teststreifen misst die Ionenkonzentration des Urins, welche in Relation zum USG steht (SMITH et al., 1983; OSBORNE et al., 1995). Wenn der Teststreifen mit Urin benetzt wird, werden Protonen freigesetzt, welche mit einem pH-Indikator des Teststreifens reagieren, die wiederum in einem Farbumschlag resultieren (PRADELLA et al., 1988; LORD, 1999; CHADHA et al., 2001). Die relative Dichte der Urinprobe wird deshalb indirekt bestimmt, indem die pH-basierte Farbänderung mit einer Farbtabelle verglichen wird, die mit Urinen von bekannter relativer Dichte kalibriert wurde (LORD, 1999). Das Ablesen erfolgt nach einer Inkubationszeit von 45 bis 60 Sekunden (TAYLOR & WALKER, 1982; ASSADI & FORNELL, 1986; PRADELLA et al., 1988; CHADHA et al., 2001). Teststreifen messen das USG in einem Bereich von 1.000 bis 1.025 oder 1.030 (OSBORNE et al., 1995; NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b).

Die Ergebnisse bisheriger Studien hinsichtlich der Zuverlässigkeit der Teststreifenmethode für die Messung des USG ergaben kontroverse Ergebnisse. DEFONTIS und Mitarbeiter untersuchten die Korrelation zwischen visueller bzw. automatischer Teststreifenbestimmung mit der Refraktometermessung als Referenzmethode bei 101 Hunde- ($r = 0,63$ bzw. $0,78$), 50 Katzen- ($r = 0,72$ bzw. $0,83$) und 100 Rinderurinproben ($r = 0,36$ bzw. $0,64$) und befanden die Teststreifenmethode als ungeeignet (DEFONTIS et al., 2013). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch weitere Studien mit Urinproben von Hunden und Ratten (PAQUIGNON et al., 1993; BAUER et al., 2008). Eine schlechte Korrelation zeigten auch mehrere humanmedizinische Studien (ADAMS, 1983; ZACK, 1983; DORIZZI & CAPUTO, 1998; DE BUYS ROESSINGH et al., 2001; STUEMPFLE & DRURY, 2003). Andere Studien betrachteten die Teststreifenmethode zur Messung des USG als nützliche Messmethode. GOUNDEN und Mitarbeiter verglichen das USG in einer humanmedizinischen Studie, welches mittels Teststreifen gemessen wurde, mit dem USG aus Refraktometrie, Osmolalität und Hydrometer als Referenzmethoden und

ermittelten hohe Korrelationskoeffizienten ($r = 0,906$, $r = 0,831$ und $r = 0,900$), weshalb die Teststreifenmethode als zuverlässig angesehen wurde (GOUNDEN & NEWALL, 1983). Andere humanmedizinische Studien zeigten ähnliche Ergebnisse (FREW et al., 1982; LUFT et al., 1984).

3.1.2. Direkte Methoden zur Messung des urinspezifischen Gewichts

Direkte Methoden zur Bestimmung des urinspezifischen Gewichts stellten die ersten zuverlässigen Methoden für die Messung des urinspezifischen Gewichtes dar (CHADHA et al., 2001). Die Messung des USG mittels Hydrometer des urinspezifischen Gewichtes basierend auf der Gravimetrie begann im 17. Jahrhundert durch den Vergleich der Gewichte von gleichen Mengen Urin und purem Wasser. Diese Methode ist für den täglichen Gebrauch jedoch nicht praktikabel (PRADELLA et al., 1988; CHADHA et al., 2001). Trotz der Evaluierung mehrerer gravimetrischer Methoden, sind die meisten Kliniker nur noch mit dem Hydrometer vertraut (CHADHA et al., 2001).

3.1.2.1. Hydrometer

Ein Hydrometer misst nach dem Archimedischen Prinzip: Wenn das Hydrometer in eine Lösung wie Urin eingetaucht wird, dann verdrängt das Hydrometer soviel Flüssigkeit bis die Gewichtskraft der verdrängten Flüssigkeit der Gewichtskraft des eingetauchten Hydrometers entspricht (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b).

Das Hydrometer misst die Dichte von Urin durch die Spannkraft eines Senkbleis mit einem dünnen Stiel, in dem sich eine Skala befindet (PRADELLA et al., 1988; LORD, 1999; CHADHA et al., 2001). Das Hydrometer wird in destilliertem Wasser und Standardlösungen mit bekannten Dichten kalibriert (PRADELLA et al., 1988; LORD, 1999). Vor der Eingabe des Hydrometers in den Urin muss das Hydrometer gesäubert und mit einer kleinen Menge der Lösung abgespült werden (PRADELLA et al., 1988; LORD, 1999). Die zu bestimmende Flüssigkeit wird in ein Glas mit einer definierten Größe eingegeben. Die Senkspindel wird mit einer drehenden Bewegung in die Flüssigkeit getaucht, um sicherzustellen, dass sie frei im Messzylinder schweben kann (PRADELLA et al., 1988; LORD, 1999; CHADHA et al., 2001). Der Wert am unteren Ende des Meniskus wird abgelesen, bei welchem die Senkspindel in vertikaler Position zum Stillstand gekommen ist (LORD, 1999; CHADHA et al., 2001).

Hydrometer sind auf eine Referenztemperatur kalibriert, welche nahe der Raumtemperatur liegt (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Die Ergebnisse können deshalb bei der Messung bei unterschiedlichen Temperaturen variieren (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Aus diesem Grund müssen Korrekturen für die Temperatur durchgeführt werden (LORD, 1999). Auch Protein und Glukose können das hydrometrisch bestimmte USG beeinflussen. Das USG steigt pro 10 Gramm pro Liter (g/l) Glukose um 0.004 an und pro 4 g/l Protein um 0.001 (LORD, 1999). Somit werden auch Korrekturen bei Urinproben mit Protein und Glukose durchgeführt (LORD, 1999).

Verglichen mit der Messung mittels Refraktometer oder der Bestimmung der Osmolalität, ist die Hydromettermessung oftmals ungenau (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Dies liegt an der Schwierigkeit, den Wert am Meniskus abzulesen (MAGATH, 1955; NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Zudem tendiert das Hydrometer dazu, an den Seiten des Zylinders zu schleifen, was zu ungenauen Messungen führen kann (MAGATH, 1955). Ein weiterer Nachteil der Messung mittels Hydrometer ist eine relativ große benötigte Probenmenge (WOLF & PILLAY, 1969; TAYLOR & WALKER, 1982; GOUNDEN & NEWALL, 1983; DANNEHOWER et al., 1984; PRADELLA et al., 1988) sowie die leichte Zerbrechlichkeit des Hydrometers (TAYLOR & WALKER, 1982).

3.1.2.2. Falling Drop

Ein Tropfen Urin wird in eine Säule getropft, die ein organisches Lösungsmittel mit bekannter spezifischer Dichte enthält (PRADELLA et al., 1988; LORD, 1999). Die Messung der Geschwindigkeit, welche der Tropfen benötigt um eine bestimmte Strecke entlang der Säule zu durchqueren wird genutzt, um das USG zu berechnen (WINSTEAD et al., 1963; PRADELLA et al., 1988). Die Methode wurde in einer Studie mit Saccharose kalibriert (WINSTEAD et al., 1963). Eine Lösung mit einem spezifischen Gewicht von 1.003 benötigte 50 ± 3 Sekunden um eine Strecke von 12 Inch zu durchqueren (WINSTEAD et al., 1963). Die Falling Drop Messung wird als einfache und schnelle Methode zur Bestimmung des USG angesehen (KAGAN, 1938; WINSTEAD et al., 1963). Diese Messmethode wurde in eine automatische Methode transferiert (CLEMENS & HURTLE, 1972). Die automatische Methode liefert präzise Ergebnisse verglichen mit Messungen durch das Refraktometer (HAGER et al., 1972).

3.1.2.3. Vibrating Capillar

Diese Technik basiert auf dem Prinzip, dass die Häufigkeit von Geräuschvibrationen in Bezug zu der Dichte des Mediums steht, welche sie durchdringen muss (LORD, 1999). Die Messung von Veränderungen bei harmonischen Wellenschwingungen kann genutzt werden, um das urinspezifische Gewicht zu berechnen (GANGWER et al., 1986). Basierend auf diesem Prinzip wurden semiautomatische Messinstrumente entwickelt (PRADELLA et al., 1988). Für die Messung werden Proben von 2 ml benötigt (PRADELLA et al., 1988). Eine Linearität der Messungen der harmonischen Wellenschwingungen konnte für ein USG von 1.002 bis 1.085 gezeigt werden (GANGWER et al., 1986).

3.2. Messung der Osmolalität

Die Messung der Osmolalität wird als Goldstandard zur Beurteilung der Nierenkonzentrierungsfähigkeit betrachtet (BROCK et al., 2013; SOUZA et al., 2015). Die Osmolalität ist ein zuverlässiges Hilfsmittel bei der Bestimmung der Nierenfunktion bei klinischen Fällen wie akuter Niereninsuffizienz oder chronischer Nierenerkrankung (SOUZA et al., 2015). Die Osmolalität wird heute jedoch nicht mehr routinemäßig bestimmt, seitdem sich andere Methoden wie die refraktometrische Messung des USG durchgesetzt haben (SOUZA et al., 2015). Die Messung der Osmolalität sollte jedoch durchgeführt werden, wenn wichtige klinische Entscheidungen getroffen werden müssen (KNAPP, 1982), z. B. bei undiagnostizierter persistierender Polyurie oder wenn Fehler bei der Bestimmung der Nierenfunktion von signifikanter Konsequenz sind (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Die Osmolalität des Harns und die Serumosmolalität wird ebenso gemessen, um bei der Diagnose und dem Management von Polyurie, Hybernatriämie und Hyponatriämie zu helfen (BEVAN, 1978c; BEZUIDENHOUT et al., 2016).

3.2.1. Osmometrie

Die Osmometrie ist eine Technik zur Messung der Konzentration von Partikeln in einer Lösung (BEVAN, 1978b). Die osmolare Konzentration kann entweder als Osmolalität oder als Osmolarität angegeben werden. Dabei bezieht sich die Osmolalität auf die Anzahl der Mole der osmotisch aktiven Partikeln pro Kilogramm der Lösung (mOsm/kg), während sich die Osmolarität auf die Anzahl der Mole der Partikel pro Liter der Lösung bezieht (BEVAN, 1978b; BARR &

PESILLO-CROSBY, 2008). Dabei unterscheiden sich beide darin, dass die Osmolarität durch Veränderungen der Temperatur der Lösung beeinflusst wird, während dies bei der Osmolalität nicht der Fall ist (LORD, 1999; CHADHA et al., 2001). Dieser Unterschied ist jedoch nicht von klinischer Relevanz und vernachlässigbar und meistens werden die Begriffe auswechselbar verwendet (BARR & PESILLO-CROSBY, 2008).

In der klinischen Medizin wird die osmotische Konzentration mittels Osmometer bestimmt (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Bei dieser Bestimmung nutzt man die Tatsache, dass die Lösung einer oder mehrerer Substanzen in einem Lösungsmittel zu einer Änderung der vier mathematisch in Wechselbeziehung stehenden physikalischen Eigenschaften führt: dem osmotischen Druck, dem Gefrierpunkt, dem Dampfdruck und dem Siedepunkt (OSBORNE et al., 1995).

Wenn eine gelöste Substanz, z. B. NaCl zu einem Lösungsmittel hinzugefügt wird, dann führt dies zu

- einem Anstieg des osmotischen Drucks
- einem Abfall des Dampfdrucks
- einem Anstieg des Siedepunkts
- einem Abfall des Gefrierpunktes (ABELE, 1963; OSBORNE et al., 1995; LORD, 1999; NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b).

Diese Charakteristika einer Lösung werden auch als kolligative Eigenschaften bezeichnet (PRADELLA et al., 1988; LORD, 1999). Sie variieren abhängig von der gesamten Anzahl der gelösten Partikel pro Menge Lösungsmittel und sind unabhängig von der Homogenität oder Nichthomogenität der molekularen Art, dem Molekulargewicht und der Molekülgröße (OSBORNE et al., 1995; LORD, 1999). Theoretisch lässt sich jede dieser vier kolligativen Eigenschaften als Basis für die Osmolalitätsmessung nutzen (LORD, 1999). Die Osmolalität wird klinisch in der Regel mittels Gefrierpunktserniedrigung oder Dampfdruckerniedrigung bestimmt (CHADHA et al., 2001; WILLARD & TVEDTEN, 2006a; NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Dabei messen die Osmometer die Veränderungen des Gefrierpunktes oder des Dampfdruckes unbekannter Lösungen und nutzen Standardlösungen als Referenzpunkte (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b).

3.2.1.1. Gefrierpunktserniedrigung (Freezing point depression osmometer)

Die Gefrierpunktserniedrigung nutzt die Tatsache, dass eine Lösung mit einer Osmolalität von 1 Mol pro Liter (mol/l) einen um 1,86 Grad Celsius (°C) niedrigeren Gefrierpunkt als Wasser besitzt (CHADHA et al., 2001; NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Die Messung basiert somit auf dem Prinzip, dass jedes Mol eines gelösten Stoffes den Gefrierpunkt einer Flüssigkeit um 1,86 °C senkt. Wenn die gelöste Substanz in einem reinen Lösungsmittel gelöst wird, dann ändert sich die kolligative Eigenschaft der Lösung in direkter Proportion zu der gelösten Konzentration (KOUMANTAKIS & WYNDHAM, 1989).

Die Probe wird in das Gerät eingefüllt. Die Probe wird innerhalb einer Kühlflüssigkeit heruntergekühlt (LORD, 1999). Ein schneller Rührmechanismus wird genutzt, um Kristallisation herbeizuführen (BEVAN, 1978b; LORD, 1999). Die Temperatur steigt dann aufgrund latenter Hitze der Kristallisation an (LORD, 1999). Ein Thermistor misst die Temperatur und vergleicht diese mit Standardlösungen, wodurch die Bestimmung der Osmolalität möglich ist (LORD, 1999).

Die Gefrierpunkterniedrigung wurde häufiger zur Bestimmung der Osmolalität genutzt als die Bestimmung des Siedepunkts oder des osmotischen Drucks (FORMAN & CHANGUS, 1968). Diese Messmethode hat den Vorteil gegenüber der Bestimmung mittels Dampfdruckerniedrigung, dass die Osmolalität auch in Anwesenheit von leichtflüchtigen Substanzen, z. B. Alkohol gemessen werden kann (ROCCO, 1976; SWEENEY & BEUCHAT, 1993). Die Messung in Anwesenheit von Ethanol würde zu einer Unterschätzung der Osmolalität durch die Dampfdruckerniedrigung führen (ROCCO, 1976; BARR & PESILLO-CROSBY, 2008).

3.2.1.2. Dampfdruckerniedrigung (Vapour pressure osmometer)

Die Dampfdruckerniedrigung basiert auf dem Prinzip, dass eine Verringerung des Dampfdrucks einer Lösung zu einem Abfall des Taupunkts führt (LORD, 1999). Der Taupunkt ist die Temperatur, bei welcher der gesättigte Dampfdruck dem aktuellen Dampfdruck des enthaltenen Wasserdampfes entspricht (LORD, 1999).

Ein Filterpapier wird in der zu messenden Probe getränkt und in eine Messkammer verbracht, welche anschließend versiegelt wird (LORD, 1999). In

dieser Kammer befinden sich zwei empfindliche Halbleiter-Wärmefühler (BEVAN, 1978b). Wenn Wärme und Dampfdruck einen Gleichgewichtszustand erreicht haben, wird der Wärmefühler unter den Taupunkt gekühlt, wodurch Wasser auf dem Wärmefühler kondensiert und Kondensationswärme frei wird (LORD, 1999). Die Temperatur des Wärmefühlers steigt aus diesem Grund an bis sie den Taupunkt erreicht, bei welchem kein Wasser mehr kondensiert (BEVAN, 1978b; LORD, 1999). Die Temperatur des Wärmefühlers wird mit Standardlösungen verglichen, um die Osmolalität zu berechnen (LORD, 1999).

Kommerziell erhältliche Dampfdruck-Osmometer haben einen Messbereich zwischen 100 und 3000 Millimol pro Kilogramm (mmol/kg) (SWEENEY & BEUCHAT, 1993). Es werden relativ geringe Probenmengen benötigt (BEVAN, 1978b). Die Methode der Dampfdruckerniedrigung ist im Vergleich zur Gefrierpunkterniedrigung weniger präzise (KOUMANTAKIS & WYNDHAM, 1989). Ein weiterer Nachteil ist, dass die Dampfdruckerniedrigung nicht bei Anwesenheit leicht flüchtiger Substanzen, wie z. B. Ethanol bestimmt werden kann (ROCCO, 1976). Diese Messmethode würde die leicht flüchtigen Substanzen nicht erkennen (DRAVIAM et al., 1984). Dampfdruck-Osmometer sind jedoch bei Urinproben mit hoher Osmolalität der Messung mittels Gefrierpunkterniedrigung vorzuziehen (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013a).

3.2.1.3. Kolloid osmotischer Druck (Osmotic pressure)

Die Osmolalität beschreibt den osmotischen Druck einer Lösung, wenn ein gelöster Stoff, z. B. Salz oder Zucker, zu einem klaren Lösungsmittel wie Wasser zugefügt wird (SWEENEY & BEUCHAT, 1993). Erste Untersuchungen des osmotischen Drucks fanden im Jahre 1877 durch den Botaniker Pfeffer statt. Dieser definierte den osmotischen Druck als den Druck, der aufgewendet werden muss, um die Netto-Passage von gelösten Molekülen durch eine semipermeable Membran zu verhindern. Der kolloid osmotische Druck oder onkotische Druck beschreibt einen Gleichgewichtszustand, bei welchem zwei Lösungen, von der eine kolloidale Partikel enthält, durch eine semipermeable Membran getrennt sind (MORISSETTE, 1977). Das Van't-Hoff'sche Gesetz zeigt den Zusammenhang zwischen osmotischem Druck, osmotischer Konzentration und Temperatur:

$$\pi V = R T \text{ oder } \pi = C R T$$

π = osmotischer Druck

V = Volumen der Lösung

R = Gaskonstante

T = absolute Temperatur

C = Konzentration des gelösten Stoffes in mol/l (BEVAN, 1978b; PRADELLA et al., 1988; SILBERNAGEL & DESPOPOULOS, 2007).

Demnach kann die Konzentration bestimmt werden, wenn der osmotische Druck einer Lösung bei einer vorgegebenen Temperatur gemessen wird (BEVAN, 1978b). Eine solche Beziehung besteht nur bei verdünnten Lösungen (PRADELLA et al., 1988).

Der kolloid osmotische Druck von Plasma oder Serum kann durch ein Osmometer gemessen werden, welches aus einer Probenzelle besteht, die von einer Referenzzelle durch eine synthetische Membran getrennt ist, welche die vaskuläre Membran simulieren soll (BEVAN, 1978b; LORD, 1999). Die semipermeable Membran muss für kleine Moleküle vollständig permeabel sein, aber impermeabel für größere Moleküle (MORISSETTE, 1977). Das Serum des Patienten wird in die Probenzelle gegeben (LORD, 1999). Die Referenzzelle enthält isotonische Salze, um einen ähnlichen Effekt wie die interstitielle Flüssigkeit zu erzeugen (LORD, 1999). Es findet eine Netto-Wanderung von Wassermolekülen und diffusionsfähigen gelösten Ionen von der Referenzzelle in die Probenzelle statt (MORISSETTE, 1977; LORD, 1999). Der daraus resultierende negative Druck in der Referenzzelle wird durch einen Signalwandler erkannt und in einen Druck umgewandelt, wenn der Gleichgewichtszustand erlangt wird (BEVAN, 1978b; LORD, 1999).

Der osmotische Druck wird in der Praxis nur sehr selten bestimmt aufgrund der Schwierigkeit eine perfekte semipermeable Membran zu erhalten (SWEENEY & BEUCHAT, 1993).

3.2.1.4. Siedepunkt (Boiling point)

Die Messung der Osmolalität durch die Siedepunktbestimmung macht sich die Tatsache zu Nutze, dass ein Gemisch bei einer bestimmten Temperatur in der Phase (fest, flüssig oder gasartig) besteht, welche das niedrigste chemische Potenzial besitzt (SWEENEY & BEUCHAT, 1993).

Die Siedepunkterhöhung wird nur selten zur Bestimmung der Osmolalität genutzt, da die Methode nicht geeignet für Lösungen ist, die Substanzen enthalten, welche bei hohen Temperaturen instabil sind (SWEENEY & BEUCHAT, 1993).

4. Einfluss verschiedener Parameter auf das USG

Das urinspezifische Gewicht als Messung der Dichte ist abhängig von der Anzahl, der Größe und der chemischen Zusammensetzung der im Urin gelösten Partikel, während die Osmolalität als Bestimmung der totalen Konzentration lediglich von der Anzahl der im Urin befindlichen Partikel beeinflusst wird (CHADHA et al., 2001; NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Aus diesem Grund hat jede gelöste Substanz ihren eigenen charakteristischen Einfluss auf das USG sowie die Osmolalität. Auch die einzelnen Methoden zur Messung des USG werden auf unterschiedliche Weise beeinflusst.

4.1. Einfluss von Protein

Normale Individuen scheiden sehr geringe Mengen von Protein im Urin aus (ROTA et al., 2012). Eine persistierend erhöhte Proteinausscheidung kann hinweisend auf eine Nierenerkrankung sein (ROTA et al., 2012). Studien, die den Einfluss von Protein auf das urinspezifische Gewicht untersuchten, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Größere Mengen Protein im Urin verursachen einen überproportionalen Anstieg des USG bei der Bestimmung mittels Refraktometer oder Urinometer (CHADHA et al., 2001). Ein Proteingehalt von 10 g/l führt zu einem Anstieg des USG um 0.003 (CHADHA et al., 2001). Experimentelle Studien zeigten, dass die Zugabe von 4 Gramm (g) Albumin zu einem Liter Urin das USG um 0.001 anstiegen ließen (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Dagegen scheinen geringere Mengen an Protein (1 g/l) einen vernachlässigbaren Einfluss auf das USG, gemessen mittels Refraktometer und Urinometer, zu haben (CHADHA et al., 2001).

Wird das USG jedoch mittels Teststreifen bestimmt, steigt das USG pro 1 g/l Protein um 0.005 an (KIRSCHBAUM, 1983; CHADHA et al., 2001). BURKARDT und Mitarbeiter zeigten jedoch in einer Studie, dass der Unterschied des USG zwischen Refraktometer und Teststreifen bis zu einem Proteingehalt von 1 g/l zu keiner Veränderung des USG um mehr als 0.002 führt (BURKHARDT et

al., 1982).

Substanzen mit einem größeren Molekulargewicht, wie Protein (Molekulargewicht = 68000) und Radiokontrastmittel haben einen minimalen Effekt auf die Osmolalität (CHADHA et al., 2001). Der Einfluss von 1 g/l bis 10 g/l Protein auf die Osmolalität ist vernachlässigbar (AUDOUIN et al., 1985; NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Bei einem Proteingehalt von 1 g/l kommt es zu einem Anstieg der Osmolalität um weniger als 1 mOsm/kg (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Der Proteingehalt von 10 g/l führt zu einem Anstieg von lediglich 3 mOsm/kg (CHADHA et al., 2001).

4.2. Einfluss von Glukose

Das Vorkommen von Glukose im Urin verursacht wie Protein einen Anstieg des urinspezifischen Gewichtes bei der Messung durch ein Hydrometer oder ein Refraktometer (CHADHA et al., 2001). Pro 10 g/l Glukose steigt das USG um 0.004 an (LORD, 1999; CHADHA et al., 2001; MORITZ, 2013). Werden 2,7 g Glukose zu einem Liter Urin hinzugefügt steigt das USG um 0.001 (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b).

Die kolorimetrische Bestimmung des USG mittels Teststreifen wird durch Glukose nicht wesentlich beeinflusst (BURKHARDT et al., 1982; PRADELLA et al., 1988; CHADHA et al., 2001). In einer experimentellen Studie führte die Zugabe von 1 mol (180 g) Glukose zu einem Liter Urin zu einem nur geringen Anstieg des USG (KIRSCHBAUM, 1983). Dieser Anstieg entsprach lediglich 11 % des Anstiegs bei hydrometrischer Messung des USG nach dieser Glukosezugabe (KIRSCHBAUM, 1983).

Die Osmolalität wird ebenfalls durch das Vorhandensein von Glukose beeinflusst. Ein Glukosegehalt von 10 g/l führt zu einem Anstieg der Osmolalität um etwa 55 mOsm/kg (CHADHA et al., 2001).

4.3. Einfluss der Temperatur

Urin ist eine heterogene Lösung, welche zahlreiche Bestandteile enthält, von denen manche labil sind und sich mit der Zeit verändern (WIWANITKIT, 2010). Die Dichte sowie der refraktive Index einer Lösung werden durch Veränderungen der Temperatur beeinflusst (CHADHA et al., 2001). Die Dichte des Urins sinkt mit dem Anstieg der Temperatur (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b).

Umgekehrt steigt die Urindichte mit einem Temperaturabfall (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Die Bestimmung des USG mittels Hydrometer und auch mittels Refraktometer ist empfindlich gegenüber Temperaturveränderungen (GOUNDEN & NEWALL, 1983; CHADHA et al., 2001). Eine Messung des USG nahe der Körpertemperatur würde zu einer signifikanten Unterschätzung der Dichte führen (CHADHA et al., 2001). So entspricht ein bei 37 °C gemessenes USG von 1.018 einem wahren Wert von 1.025, wenn dieses bei einer Vergleichstemperatur von 16 °C bestimmt wird (CHADHA et al., 2001). Hydrometer sind auf einer Referenztemperatur geeicht, welche in der Regel nahe der Raumtemperatur liegt (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Die Korrektur für die Temperatur wird durch Subtraktion von jeweils 0.001 Einheiten pro 2 °C bzw. 3 °C durchgeführt.

Die heute erhältlichen Refraktometer sind in der Regel temperaturkompensiert. Das System der Temperaturkompensation geht auf den Erfinder Herbert Goldberg zurück (GEORGE, 2001). Die Messungen werden automatisch um 0.001 Einheiten pro 3 °C angeglichen (PRADELLA et al., 1988).

Die Messung des USG mittels Teststreifen wird durch die Temperatur nicht beeinflusst (CHADHA et al., 2001). TAYLOR und Mitarbeiter zeigten, dass die Messung bei einer Urintemperatur zwischen 4 °C und 37 °C nicht beeinflusst wurde (TAYLOR & WALKER, 1982).

4.4. Einfluss des pH-Wertes

Der pH-Wert hat keinen Einfluss auf die Messung des USG mittels Hydrometer oder Refraktometer (CHADHA et al., 2001; IMRAN et al., 2010).

Die Messung mittels Teststreifen basiert auf dem Prinzip der Veränderungen eines auf dem Teststreifen vorhandenen Polyelektrolyts in Relation zur Konzentration von geladenen gelösten Substanzen in Urin (NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Bei dieser Reaktion kommt es zur Freisetzung von Protonen durch das Polyelektrolyt, welche den pH-Wert der Lösung senken, was in einem Farbumschlag resultiert (BURKHARDT et al., 1982; DORIZZI & CAPUTO, 1998; NWAOKORIE & OSBORNE, 2013b). Aus diesem Grund wird die Messung des Teststreifens stark durch den pH-Wert des Urins beeinflusst (CHADHA et al., 2001). Es zeigten sich falsch niedrige Ergebnisse des USG in alkalischen Urinproben und umgekehrt (ADAMS, 1983). Die Hersteller

empfehlen deshalb eine Anpassung durch Addition von 0.005 für Urinproben mit einem pH-Wert $\geq 6,5$ (ADAMS, 1983; CHADHA et al., 2001). BURKHARDT und Mitarbeiter konnten in einer experimentellen Studie durch diese Anpassung eine Verbesserung der Korrelation zwischen Ergebnissen des Teststreifens und den Ergebnissen von Refraktometer und Hydrometer zeigen (BURKHARDT et al., 1982). Eine andere Studie erhielt keine verbesserte Korrelation durch die durchgeführte Korrektur (ADAMS, 1983). Die Messung des USG mittels Teststreifen aus alkalischen Urinproben ist nicht verlässlich (KIRSCHBAUM, 1983). Automatische Teststreifenlesegeräte führen automatisch eine Korrektur für Urinproben mit einem pH-Wert $\geq 6,5$ durch (CHADHA et al., 2001).

4.5. Einfluss von Röntgenkontrastmittel

Eine experimentelle Studie zeigte, dass die Messung des USG sowohl mittels Refraktometer als auch mittels Hydrometer durch Röntgenkontrastmittel beeinflusst wird (SMITH et al., 1983). Dabei führte die Zugabe von Kontrastmittel zu Urinproben bei einem Ausgangswert von 1.005 bis 1.006 zu einem Anstieg des USG auf 1.056 bis 1.060. Die Bestimmung durch die Teststreifenmethode und die Osmolalität werden durch Röntgenkontrastmittel nicht beeinflusst (SMITH et al., 1983).

4.6. Einfluss der Lagerungszeit

Bisherige Studien, die den Einfluss der Lagerungszeit auf das USG untersuchten, befassten sich mit kürzeren Lagerungszeiten von bis zu sieben Tagen. Eine Studie, die das USG innerhalb 60 Minuten nach Uringewinnung sowie nach einer Lagerungszeit von sechs und 24 Stunden bestimmte, ermittelte keinen signifikanten Einfluss der Lagerungszeit auf die Ergebnisse (ALBASAN et al., 2003). Zwei weitere Studien, die den Effekt einer Lagerungszeit von bis zu fünf Stunden untersuchten, zeigten ebenfalls keine klinisch relevanten Veränderungen (STEINBERG et al., 2009; VELJKOVIC et al., 2012). Eine neuere Studie hingegen konnte eine signifikante Erniedrigung des USG nach einer Lagerungszeit von zwei und sieben Tagen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und nach einem, zwei und sieben Tagen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ermitteln (ADAMS et al., 2017).

Eine Studie untersuchte den Einfluss der Lagerungszeit auf die Urinosmolalität nach 30 Minuten, drei, sechs, zwölf und 36 Stunden bei einer Lagerungstemperatur von 4 bis $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ und bei Raumtemperatur

(BEZUIDENHOUT et al., 2016). Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen Anfangsmessungen und den Messungen nach den genannten Lagerungszeiten. Die Osmolalität nach einer Lagerungszeit von 36 Stunden bei Raumtemperatur änderte sich um weniger als 1 mOsm/kg. Eine andere Studie hingegen, welche den Einfluss bei einer Lagerungstemperatur von 7 und 22 °C nach einer Lagerungszeit von einem, zwei, drei, sieben und zehn Tagen untersuchte, ermittelte eine signifikante Veränderung der Osmolalität bereits nach 24 Stunden bei einer Lagerungstemperatur von 22 °C (ADAMS et al., 2019). Bei einer Lagerungstemperatur von 7 °C blieb die Osmolalität bis zu einer Lagerungsdauer von drei Tagen stabil.

III. PUBLIKATION

Influence of preanalytic and analytic variables in canine and feline urine specific gravity measurement by refractometer

Martina Mösch

Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Munich, Germany

Sven Reese, Priv.-Doz., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil

Department of Anatomy, Histology and Embryology, LMU Munich, Munich, Germany

Karin Weber, Priv.-Doz., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil.

Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Munich, Germany

Katrin Hartmann, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Munich, Germany

Roswitha Dorsch, Priv.-Doz., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Munich, Germany

Veröffentlicht im „Journal of Veterinary Diagnostic Investigation”: 2020, 32(1):36-43.



Full Scientific Report



Influence of preanalytic and analytic variables in canine and feline urine specific gravity measurement by refractometer

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
2020, Vol. 32(1) 36–43
© 2019 The Author(s)
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/1040638719896785
jvdi.sagepub.com

Martina Mösch,¹ Sven Reese, Karin Weber, Katrin Hartmann, Roswitha Dorsch

Abstract. Urine specific gravity (USG), which is usually measured by refractometry, is an important indicator of renal concentrating ability. Few studies have evaluated refractometers with separate scales for canine and feline urine. Variables such as protein content or storage time may influence the USG. We compared the effects of measuring USG with a refractometer with single or separate scales for canine and feline urine, investigated inter- and intra-observer variability, and measured agreement between whole urine and supernatant. We evaluated the correlation between USG and osmolality, the influence of urinary protein on USG and osmolality, and the impact of storage time up to 6 mo. We examined 252 canine and 126 feline samples. Bland–Altman analysis revealed higher USG values of the single-scale refractometer than the dual-scale refractometer, with a mean difference (bias) of < 0.001 for canine and 0.003 for feline specimens. Inter- and intra-observer variability were acceptable. Good agreement was shown between USG of whole urine and supernatant. Correlations between USG and osmolality were excellent ($0.98–0.99$, $p < 0.001$). Proteinuria up to 1 g/L had no major impact on USG or osmolality. Storage time had no significant effect on USG. The difference between the refractometers is clinically irrelevant, and the use of a refractometer with separate feline and canine scales is unnecessary. Whole urine and supernatant stored up to 6 mo can both be used for USG measurement. The influence of proteinuria $< 1 \text{ g/L}$ on USG and osmolality is negligible.

Key words: canine urine; feline urine; osmolality; proteinuria; refractometer; storage time; urine specific gravity.

Introduction

Evaluation of renal concentrating ability is an important test to confirm diagnoses of chronic kidney disease or acute kidney injury.¹⁰ Osmolality is the gold standard for evaluating the kidney's urine concentration ability, but determination of urine specific gravity (USG) is commonly used as a practical alternative and is considered a sensitive test of renal concentrating ability.²⁴ USG is defined as the ratio of the weight of a volume of urine to the weight of the same volume of distilled water and is affected by the number, molecular mass, and chemical structure of particles.²⁴ In contrast, osmolality is the total solute concentration and is only affected by the number of particles.⁷ For this reason, heavier molecules, such as proteins, should have a larger effect on USG than on osmolality. Reference methods to measure USG are pycnometry and measurement of total solids after drying. Despite inconsistencies between results obtained by reference methods and refractometry,¹⁹ the latter is used in most veterinary clinics and laboratories. Determination of USG with a refractometer is simple to perform and inexpensive.

Formulas for the relationship between total solids and USG in human, canine, and feline urine samples were developed 60 y ago.¹⁶ Urine samples of 190 humans, 21 dogs, and 22 cats were included. The refractive index for all samples

together was higher than the refractive index for human samples alone. In that study, all 22 feline samples had specific gravities > 1.030 ; the 21 canine and 190 human urines were more dilute. Based on these calculations, refractometers with separate scales for canine and feline urine samples have been available for several years, but only a few studies have examined their usefulness for measurement of USG in feline urine samples.^{4,19} Previous studies have compared osmolality and USG measured by refractometry, and most had good correlation.^{8,9,12} Refractometry is therefore accepted as an adequate surrogate of osmolality.⁷ Although a 2002 study demonstrated an impact of proteinuria on USG and osmolality,²³ this was not confirmed in a 2013 study.³

In human and veterinary practice, measurement of USG is usually performed by using fresh whole urine immediately after collection. However, in laboratory studies, USG or osmolality is often determined from stored urine supernatants. A

Clinic of Small Animal Medicine (Mösch, Weber, Hartmann, Dorsch), Department of Anatomy, Histology and Embryology (Reese), Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Bavaria, Germany.

¹Corresponding author: Martina Mösch, Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich 80539, Germany. marmoesch@web.de

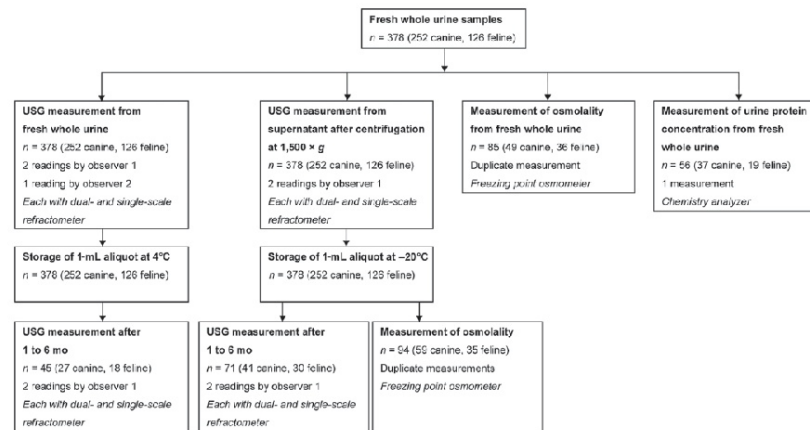


Figure 1. Urine specimen handling scheme. Observer 1 performed 2 readings with each refractometer, the dual-scale and the single-scale refractometer. Observer 2 did one reading with each refractometer. The measurement of urine specific gravity (USG) from supernatant was only performed by observer 1 who did 2 readings with each refractometer. Urine protein concentration was measured in 56 of 85 samples in which determination of osmolality was performed. Repeated USG measurements after storage were performed by observer 1 (2 measurements with each refractometer). Osmolality after storage was measured in 94 samples. In 80 samples, osmolality of both fresh whole urine and of stored supernatant was determined. For all statistical analyses including USG, the first reading of observer 1 was used.

difference between whole urine and supernatant USG has not been reported, nor how prolonged storage time of weeks or months influences the results, to our knowledge.

Our aims were 1) to compare 2 optical refractometers, one with a single scale and one with separate scales for canine and feline urine samples, 2) to evaluate inter- and intra-observer variability, 3) to measure the agreement between whole urine and supernatant USG, 4) to evaluate the correlation between USG and osmolality, 5) to investigate the influence of protein content on the correlation between USG and osmolality, and 6) to determine the influence of up to 6 mo of storage on USG.

Materials and methods

Urine specimens from dogs and cats presented to the Clinic of Small Animal Medicine at the Ludwig-Maximilians-University (LMU) in Munich, Germany because of health issues, and from healthy dogs and cats of clinic staff members, were consecutively collected from June 2015 to April 2016. Dogs and cats were included regardless of breed, age, sex, medical condition, or method of urine collection. Inclusion criteria were a minimum volume of urine of 3.0 mL and the ability to examine the samples within 1 h of collection. Analyses were performed by 2 independent blinded observers (defined as observers 1 and 2; Fig. 1). The study was approved by the ethical committee of the veterinary faculty of the LMU Munich (50-15-06-2015).

All statistical analyses were conducted using MedCalc statistical software v.16.4.3 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). A $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Refractometer comparison

USG of fresh whole urine was determined by an optical hand-held clinical refractometer (Rhino Vet 360; Reichert Analytical Instruments, Depew, NY) with separate scales for dogs and cats, and with an optical bench-top refractometer (SPR-T2; Atago, Tokyo, Japan) with a single scale, referred to as dual-scale and single-scale refractometers, respectively. The former has a refractometer range of 1.000–1.060; the latter has a single common reading scale with a range of 1.000–1.050. Two drops (~0.1 mL total) of fresh whole urine were placed on the prism of each refractometer. Both devices were calibrated to 1.000 with distilled water after every 5 readings and cleaned with a soft tissue after each sample. USG was measured once with each instrument by observer 2, and twice by observer 1, using either the dog or the cat scale of the dual-scale refractometer as was species appropriate. The mean differences (bias) of USG readings between refractometers were evaluated with Bland–Altman analysis using the first readings of observer 1, against the assumption that there would be no significant difference between refractometers. Good agreement was defined relative to a refractometer's minimum resolution of 0.005.

Evaluation of inter- and intra-observer variability

Whole urine USG was measured with each refractometer twice by observer 1 and once by observer 2. Observers 1 and 2 were blinded to each other's readings. For evaluation of intra-observer variability, the duplicate readings of observer 1 were used. For evaluation of inter-observer variability of the refractometer results, the first reading of observer 1 and the reading of observer 2 were used. Usually, several urine samples (≤ 10 samples) were investigated at the same time by observer 1. The second measurement of observer 1 was performed on all samples directly after the first measurement within 20 min and using a different randomly selected order to ensure that observer 1 was blinded to the first reading. When only one urine sample was analyzed, observer 1 could not be blinded to the first reading. Readings were then performed by observer 2. Inter- and intra-observer variability were calculated by a coefficient of variation for repeated measurements (CV).

USG agreement between whole urine and supernatant

After USG measurement of fresh whole urine samples, urine specimens were centrifuged for 5 min at $1,500 \times g$. The supernatant was separated for the measurement of USG using the dual-scale and the single-scale refractometers twice by observer 1. The measurements of observer 1 were performed in the same way as described above. The agreement between results of whole urine and supernatant was evaluated with Bland–Altman analysis using the first readings of observer 1.

USG and osmolality correlation

One aliquot of the supernatant of all samples was frozen at -20°C and stored until determination of urine osmolality. Osmolality was measured in a subset of fresh whole urine samples and stored supernatant aliquots. Frozen supernatants were brought to room temperature. Urine osmolality was measured in duplicate with a freezing-point depression osmometer (Automatic semi-micro; Knauer, Berlin, Germany). Two-point calibration was done with distilled water (0 mOsm/kg) and a 400 mOsm/kg solution according to the manufacturer's instructions. USG measurements of fresh whole urine and the frozen supernatant (first reading of observer 1 of each) were used to calculate the correlation between osmolality of fresh whole urine and USG and between osmolality of stored supernatants and USG, respectively.

The relationship between USG readings obtained with each refractometer and osmolality was measured by Pearson correlation coefficient. Duplicate osmolality measurements of the initially measured fresh whole urine samples were used to assess repeatability using CV.

Influence of protein on USG and osmolality

To evaluate the influence of protein on USG and osmolality, protein was determined in a subset of fresh whole urine samples in which measurement of USG and osmolality was performed as described above. Urine protein concentration was measured (Cobas INTEGRA 400 plus chemistry analyzer; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Linear regression analysis was performed to examine the influence of protein on the relationship between USG and osmolality. For USG, the first readings of observer 1 were used for this analysis.

Influence of storage time on USG

To assess the influence of storage time on USG measurement, whole urine samples and supernatants were stored at 4°C and at -20°C , respectively. A subset of the samples was measured again after a storage time of 1–6 mo. Specimens were brought to room temperature prior to measuring. USG of the whole urine and the supernatant was measured twice by observer 1 using the 2 refractometers. The comparison between fresh and stored whole urine as well as between fresh and stored supernatant was performed with Bland–Altman analysis using the first readings of observer 1.

Results

Of the 252 canine and 126 feline specimens in our study, 232 were collected via cystocentesis, 6 were catheter-derived samples, and 140 samples were free-catch. All cystocentesis- and catheter-derived urine samples, as well as 115 free-catch samples, were obtained from patients in which a urinalysis was medically indicated for further investigation; 25 free-catch samples were collected from dogs and cats of staff members of the clinic. The canine sample consisted of 119 males (41 castrated, 78 intact) and 133 females (84 spayed, 49 intact). The cat sample included 75 males (51 castrated, 24 intact) and 51 females (44 spayed, 7 intact). Ages of dogs were 2 mo to 16 y (mean \pm SD, 7.8 ± 4.4 y) and of cats were 7 mo to 20 y (9.0 ± 4.7 y). For patients presented because of clinical problems (Supplementary Table 1), USG of canine whole urine was 1.004–1.053, and for feline specimens was 1.002 to > 1.060 . USG of clinically normal dogs and cats was 1.019 to > 1.060 and 1.020–1.042, respectively. Osmolality measurements of supernatant for clinical patients were 108–2,070 mOsm/kg for canine samples and 87–2,640 mOsm/kg for feline specimens. Osmolality of clinically normal dogs and cats was 689–2,020 mOsm/kg and 760–1,860 mOsm/kg, respectively.

Refractometer comparison

There was good agreement between the 2 refractometers for measurements of USG of fresh whole urine ($p < 0.001$ for dog and cat samples) and fresh supernatant ($p = 0.002$ for dog samples, $p < 0.001$ for cat samples). The mean difference

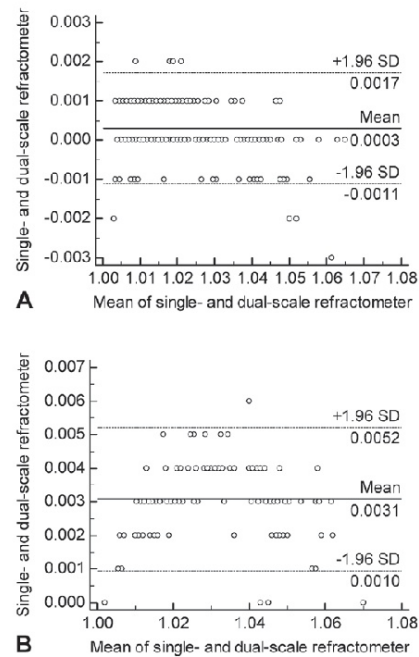


Figure 2. Bland–Altman plot of fresh whole canine and feline urine specific gravity (USG) measured on single-scale and dual-scale refractometers. **A.** Bland–Altman plot for canine urine samples. **B.** Bland–Altman plot for feline urine samples. The solid line represents the mean difference, and the dashed lines represent the limits of agreement (= mean difference \pm 1.96 standard deviation (SD) of differences).

(bias) in USG of fresh whole urine between the 2 refractometers was < 0.001 (95% limits of agreement (LOA): -0.001 to 0.002) in dog samples and 0.003 (95% LOA: 0.001 – 0.005) in cat samples (Fig. 2). The single-scale refractometer (mean 1.032 for fresh native urine) consistently had higher values than the dual-scale refractometer (mean 1.029 for fresh whole urine) for feline urine specimens. The bias in fresh supernatant was < 0.001 for canine (95% LOA: -0.001 to 0.002) and 0.003 for feline specimens (95% LOA: 0.001 – 0.005 ; Supplementary Table 2). The single-scale refractometer results (mean 1.023 for fresh whole urine) were higher on average than the dual-scale refractometer readings (mean 1.023 for fresh whole urine) for canine specimens.

Inter- and intra-observer variability

The intra-observer variability of both refractometers was determined by measuring specimens of fresh whole urine

and fresh supernatant in duplicate for each of the 252 canine and 126 feline specimens. The inter-observer variability for refractometer measurements showed acceptable values (CV $< 0.5\%$) for the 2 devices for fresh whole urine. The intra-observer variability (CV) for both refractometers of both fresh whole urine and fresh supernatant was 0% .

USG agreement between whole urine and supernatant

Good agreement between USG measurements of fresh whole urine and fresh supernatant was indicated by Bland–Altman analysis on 252 dog and 126 cat samples (Table 1).

USG and osmolality correlation

There was excellent correlation between readings of both refractometers and osmolality measured in 85 fresh whole urine samples (49 canine and 36 feline samples; $r=0.98$ – 0.99 ; Fig. 3) and 94 supernatants (59 canine and 35 feline samples; $r=0.98$ – 0.99 ; Table 2). The instruments had excellent repeatability: CV of 0.388% for dog and cat samples, and 0.391% for dog samples and 0.378% for cat samples, respectively.

Influence of protein USG and osmolality

The influence of urine protein on the correlation between USG and osmolality was investigated in 56 specimens (37 canine and 19 feline samples) with linear regression analysis (Fig. 4). There was no recognizable influence of urine protein up to values of 1 g/L ($p=0.087$). An increase in the USG compared with osmolality for specimens containing protein concentrations $> 1 \text{ g/L}$ was significant ($p=0.007$).

Influence of storage time on USG

Whole urine samples (27 canine samples, 18 feline samples) and supernatants (41 canine samples, 30 feline samples) were stored for a median of 3 mo (range: 1–6 mo) and 4 mo (range: 1–6 mo), respectively. Significant differences in USG before and after storage were not observed for the readings of either refractometer ($p=0.08$ – 1.00 ; Table 3).

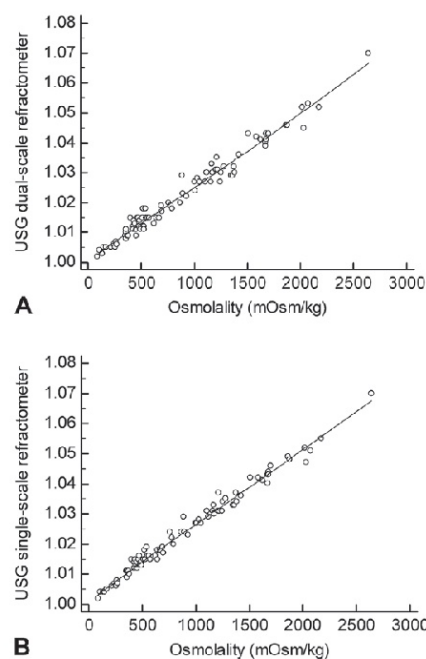
Discussion

The mean difference (bias) for the measurements of fresh whole urine was < 0.001 for canine specimens. Given that refractometers have a resolution of 0.005 , this difference is not clinically relevant because it falls outside the limit of detection. The mean difference (bias) of 0.003 for cat urine was 10-fold larger than dogs, but there was still good agreement between the 2 refractometers. For a specific patient, interpretation of the USG using a defined cutoff for concentrating ability (USG > 1.030 for dogs, USG > 1.035 for cats)¹⁴

Table 1. Agreement between canine and feline fresh whole urine and supernatant urine specific gravity (USG) measurements measured in dual-scale and single-scale refractometers.

	All samples (<i>n</i> =378)	Dog samples (<i>n</i> =252)	Cat samples (<i>n</i> =126)
Dual-scale			
Mean difference	< -0.001	< -0.001	< -0.001
95% LOA	-0.002 to 0.001	-0.002 to 0.001	-0.001 to 0.001
<i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Single-scale			
Mean difference	< -0.001	< -0.001	< -0.001
95% LOA	-0.001 to 0.001	-0.001 to 0.001	-0.001 to 0.001
<i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	0.002

LOA = limits of agreement.

**Figure 3.** Correlation scatter plot between urine specific gravity (USG) and osmolality of fresh whole urine. **A.** Correlation between the dual-scale refractometer and osmolality. **B.** Correlation between the single-scale refractometer and osmolality.

could lead to different clinical conclusions with the use of different refractometers. However, USG in healthy animals can vary widely. This was also shown in our study; USG of clinically normal dogs and cats ranged from 1.019 to > 1.060 and 1.020–1.042, respectively. Furthermore, USG can vary widely during a 24-h period.²⁰ Therefore, the assessment of

Table 2. Pearson correlation coefficient between canine and feline urine osmolality and urine specific gravity on fresh whole urine and urine supernatant measured on dual-scale and single-scale refractometers.

	All (<i>n</i> =85)	Dog (<i>n</i> =49)	Cat (<i>n</i> =36)
Fresh whole urine			
Dual-scale	0.986	0.989	0.991
<i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Single-scale	0.992	0.990	0.993
<i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	All samples (<i>n</i> =94)	Dog samples (<i>n</i> =59)	Cat samples (<i>n</i> =35)
Supernatant			
Dual-scale	0.984	0.986	0.990
<i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Single-scale	0.990	0.986	0.992
<i>p</i> value	< 0.001	< 0.001	< 0.001

kidney concentrating ability should never be based on a single measurement of USG and strict cutoff values, and the mean difference of 0.003 in USG between refractometers in feline samples is unlikely to change diagnostic and therapeutic plans in the individual patient. There are only a few studies that have investigated the usefulness of a separate scale for feline urine. In one study, USG measurements of 5 refractometers, including 1 refractometer with separate scales for cats and dogs and another refractometer for measuring only feline urine, were compared to the results with 2 reference methods for measuring USG (pycnometry and measurement of total solids after drying).¹⁹ Interestingly, the 2 refractometers designed for cat urine gave consistently lower values than the reference methods and consistently revealed the lowest USG of all refractometers, leading to the conclusion that the feline refractometers gave falsely low values of USG. Two previous studies compared USG measurements of an optical and a digital refractometer for canine urine samples¹⁵ and for feline urine specimens,⁴ resulting in a mean difference of 0.001 and

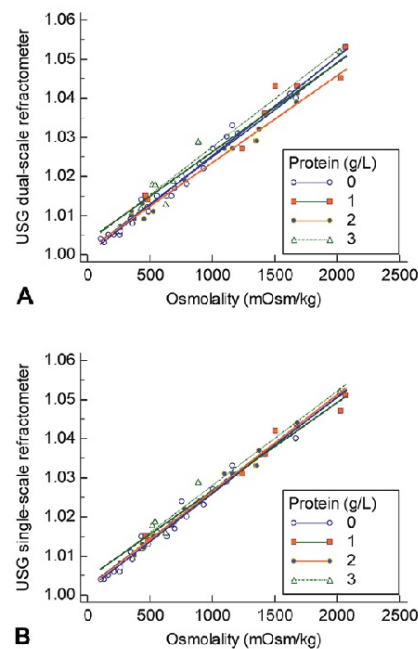


Figure 4. Correlation scatterplot of urine specific gravity (USG) and osmolality with various protein values. **A.** Scatter plot of the dual-scale refractometer and osmolality. **B.** Scatter plot of the single-scale refractometer and osmolality. The lines represent different protein concentrations: 0 = 0–0.14 g/L; 1 = 0.15–0.29 g/L; 2 = 0.3–1 g/L; 3 = >1 g/L.

0.003, respectively. These results are very similar to the results obtained in our study.

The excellent intra-observer variability in our study was similar to those reported in a previous study.¹⁵ However, in our study, we measured all samples in duplicate, whereas in that study, the USG of only 7 urine specimens was determined 8 times with the refractometers.

Contrary to the textbook recommendation to avoid the use of urine supernatant for the measurement of USG,¹¹ which is followed in many clinical studies that use whole urine,^{18,25} supernatant is used for the USG measurement and dipstick analysis in other more recent clinical studies.^{13,22} Based on our results, either whole urine or supernatant can be used for measuring USG.

The excellent correlation between USG and osmolality in our study is in agreement with earlier studies that examined this correlation.^{3,4,8,9,15} A 2015 study revealed poor correlation between USG and osmolality in urine samples

obtained from healthy human volunteers and patients with kidney diseases, with a correlation coefficient of $r=0.462$ when all urine samples were considered together.¹⁷ The correlation remained poor when urine samples without proteinuria or glucosuria were analyzed ($r=0.572$). Correlation was even poor in the healthy control group ($r=0.609$). The reason that the relationship between USG and osmolality is less consistent than in other studies is unclear to us. The calculation of the correlation coefficient has often been used in human medical studies and is still often used in veterinary medical studies as an indicator of agreement between 2 methods of measurement,⁵ but it only reflects the association between 2 methods of measurements.² The best statistical approach for calculating the agreement between 2 methods is Bland–Altman analysis. The comparison between USG and osmolality using Bland–Altman difference plots, however, is not possible because of different units of measurement.

When examining the relationship between osmolality and USG, most studies excluded specimens with protein content because of the widespread opinion that good correlation between osmolality and USG only exists in samples without proteinuria.^{8,12,26} Our results are in agreement with a 1982 study that examined the impact of proteinuria on USG measured by refractometry.⁶ In that study, the USG also did not exceed the osmolality until the protein content reached 1 g/L. However, that study examined the effect of protein by adding albumin to pooled human urine that contained no protein whereas our study investigated the correlation between USG and osmolality in naturally proteinuric dogs and cats. In our study, 14 of 56 samples (25%) had an elevated urine protein concentration of 0.3–1 g/L. A protein content of 1 g/L already represents a high protein content, which is rarely seen in patients. This is confirmed by our study in which only 7 of 56 samples (12%) had a protein content > 1 g/L. Therefore, in our study population, mild-to-moderate proteinuria was more common than severe proteinuria. The results of our study are clinically helpful in patients with a urine protein content of 0.3–1.0 g/L given that we demonstrated that USG is not affected by this small amount of protein.

The influence of shorter storage times (up to 24 h) has been investigated previously, and no significant changes were found in USG.^{1,21} However, the impact of long-term storage has not been validated. In our study, the good agreement between measurements of fresh and stored urine and supernatant demonstrates that urine can be also stored for further evaluation for longer periods of time. A limitation of our study is that the period of storage time was not exactly defined but varied from 1 to 6 mo; it can, however, be presumed that a more precisely defined storage time would not have changed the results.

Table 3. Agreement between fresh and stored canine and feline urine specific gravity whole urine and urine supernatant measured on dual-scale and single-scale refractometers.

	Fresh vs. stored whole urine		
	All samples (n=45)	Dog samples (n=27)	Cat samples (n=18)
Dual-scale			
Mean difference	< -0.001	< -0.001	< -0.001
95% LOA	-0.001 to 0.001	-0.002 to 0.001	-0.001 to 0.001
p value	0.090	0.294	0.083
Single-scale			
Mean difference	< -0.001	< -0.001	< -0.001
95% LOA	-0.001 to 0.001	-0.001 to 0.001	-0.001 to 0.001
p value	0.090	0.327	0.163
	Fresh vs. stored supernatant		
	All samples (n=71)	Dog samples (n=41)	Cat samples (n=30)
Dual-scale			
Mean difference	< 0.001	< 0.001	< 0.001
95% LOA	-0.001 to 0.001	-0.001 to 0.001	-0.001 to 0.001
p value	0.621	1.000	0.424
Single-scale			
Mean difference	< -0.001	< -0.001	< -0.001
95% LOA	-0.001 to 0.001	-0.001 to 0.001	-0.001 to 0.001
p value	0.203	0.291	0.488

LOA = limits of agreement.



Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

ORCID iDs

Martina Mösch  <https://orcid.org/0000-0002-8558-6252>
 Roswitha Dorsch  <https://orcid.org/0000-0002-7508-5411>

Supplementary material

Supplementary material for this article is available online.

References

- Albaskan H, et al. Effects of storage time and temperature on pH, specific gravity, and crystal formation in urine samples from dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003;222:176–179.
- Altman DG, Bland JM. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *Statistician* 1983;32:307–317.
- Ayoub JA, et al. Association between urine osmolality and specific gravity in dogs and the effect of commonly measured urine solutes on that association. *Am J Vet Res* 2013;74:1542–1545.
- Bennett AD, et al. Comparison of digital and optical hand-held refractometers for the measurement of feline urine specific gravity. *J Feline Med Surg* 2011;13:152–154.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307–310.
- Burkhardt AE, et al. A reagent strip for measuring the specific gravity of urine. *Clin Chem* 1982;28:2068–2072.
- Chadha VU, et al. Measurement of urinary concentration: a critical appraisal of methodologies. *Pediatr Nephrol* 2001;16:374–382.
- Dorizzi R, et al. Refractometry, test strip, and osmometry compared as measures of relative density of urine. *Clin Chem* 1987;33:190.
- Dossin O, et al. Comparison of the techniques of evaluation of urine dilution/concentration in the dog. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2003;50:322–325.
- Gounden D, Newall RG. Urine specific gravity measurements: comparison of a new reagent strip method with existing methodologies, as applied to the water concentration/dilution tests. *Curr Med Res Opin* 1983;8:375–381.
- Kindrachuck RW, Stamey TA. Urinalysis. In: Campbell's Urology. 5th ed. Philadelphia, PA: Saunders, 1986:285.
- Leech S, Penney MD. Correlation of specific gravity and osmolality of urine in neonates and adults. *Arch Dis Child* 1987;62:671–673.
- Meindl AG, et al. Relationships among urinary protein-to-creatinine ratio, urine specific gravity, and bacteriuria in canine urine samples. *J Vet Intern Med* 2019;33:192–199.

14. Osborne CA, et al. A clinician's analysis of urinalysis. In: Osborne CA, Finco DF, eds. *Canine and Feline Nephrology and Urology*. 1st ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1995;136–205.
15. Paris JK, et al. Comparison of a digital and an optical analogue hand-held refractometer for the measurement of canine urine specific gravity. *Vet Rec* 2012;170:463.
16. Rubini ME, Wolf AV. Refractometric determination of total solids and water of serum and urine. *J Biol Chem* 1957;225:869–876.
17. Souza AC, et al. Is urinary density an adequate predictor of urinary osmolality? *BMC Nephrol* 2015;16:46.
18. Treutlein G, et al. Follow-up protein profiles in urine samples during the course of obstructive feline idiopathic cystitis. *Vet J* 2013;198:625–630.
19. Tvedten HW, et al. Comparison of specific gravity analysis of feline and canine urine, using five refractometers, to pycnometric analysis and total solids by drying. *N Z Vet* 2015;63: 254–259.
20. van Vonderen IK, et al. Intra- and interindividual variation in urine osmolality and urine specific gravity in healthy pet dogs of various ages. *J Vet Intern Med* 1997;11:30–35.
21. Veljkovic K, et al. Assessment of a four hour delay for urine samples stored without preservatives at room temperature for urinalysis. *Clin Biochem* 2012;45:856–858.
22. Vientos-Plotts AI, et al. Effect of blood contamination on results of dipstick evaluation and urine protein-to-urine creatinine ratio for urine samples from dogs and cats. *Am J Vet Res* 2018;79:525–531.
23. Voinescu GC, et al. The relationship between urine osmolality and specific gravity. *Am J Med Sci* 2002;323:39–42.
24. Watson AD. Urine specific gravity in practice. *Aust Vet J* 1998;76:392–398.
25. White JD, et al. Subclinical bacteriuria in older cats and its association with survival. *J Vet Intern Med* 2016;30:1824–1829.
26. Wolf AV, Pillay VK. Renal concentration tests; osmotic pressure, specific gravity, refraction and electrical conductivity compared. *Am J Med* 1969;46:837–843.

IV. DISKUSSION

Die Urinuntersuchung ist in der Human- und Tiermedizin unverzichtbar zur Diagnose zahlreicher Erkrankungen. Die Bestimmung des USG ist ein wesentlicher Bestandteil einer vollständigen Urinanalyse (ESHAR et al., 2012). Die Osmolalität wird als Goldstandard zur Messung der Nierenkonzentrierungsfähigkeit angesehen (SOUZA et al., 2015). Die Messung des USG stellt eine einfach durchführbare Alternative dazu dar und gilt ebenfalls als sensibler Test zur Beurteilung der Fähigkeit der Nieren, den Urin zu konzentrieren (RISHNIW & BICALHO, 2015). Die Messung des USG erfolgt in der Praxis üblicherweise mittels Refraktometer. Aufgrund unterschiedlicher Refraktivitäten, sind mittlerweile Refraktometer mit separaten Skalen für Hunde- und Katzenurinproben erhältlich, welche bisher jedoch nur in wenigen Studien untersucht wurden (BENNETT et al., 2011; TVEDTEN et al., 2015). Ziele der vorliegenden Studie waren daher der Vergleich zweier optischer Refraktometer, die Überprüfung der Übereinstimmung des USG zwischen Nativurin und Überstand sowie die Untersuchung des Einflusses verschiedener Parameter auf die Korrelation zwischen USG und Osmolalität.

In der vorliegenden Studie zeigte der Vergleich zwischen einem Refraktometer mit separaten Skalen für Hunde- und Katzenurinproben (Rhino Vet 360 Clinical Refractometer) und einem humanmedizinischen Refraktometer mit einheitlicher Skala (Atago® SPR-T2) eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Refraktometern. Bei Hundeurinproben ergab sich bei Messung aus dem Nativurin eine absolute Bias von < 0.001 (95 %-Limits of Agreement (LOA): -0.001 - 0.002). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem einer Studie, in der sich mittels Bland-Altman-Analyse eine Bias von 0.0006 beim Vergleich eines digitalen und optischen Refraktometers bei Hundeurinproben ergab (PARIS et al., 2012). Betrachtet man die Skaleneinteilung eines Refraktometers mit Einheiten von 0.005 , wird deutlich, dass die Unterschiede sowohl dieser als auch der vorliegenden Studie außerhalb der Refraktometerauflösung liegen und der Unterschied, obwohl statistisch signifikant, nicht von klinischer Relevanz ist. Bei den Katzenurinproben ergab sich in der aktuellen Studie eine absolute Bias zwischen den beiden Refraktometern von 0.003 (95 %-LOA: 0.001 - 0.005). Eine frühere Studie, die ein optisches und digitales Refraktometer bei 55

Katzurinproben verglichen, ergab mit einer Bias von 0.0034 zwischen beiden Refraktometern ein vergleichbares Ergebnis (BENNETT et al., 2011). Trotz des 10-fach größeren Unterschieds im Vergleich zwischen Hunde- und Katzenurinproben in der vorliegenden Studie, ist auch hier eine gute Übereinstimmung zwischen den Refraktometern gegeben und davon auszugehen, dass ein derartiger Unterschied beim einzelnen Patienten keine Auswirkung auf das weitere diagnostische und therapeutische Vorgehen haben wird. Dabei muss auch berücksichtigt werden, dass das USG innerhalb von 24 Stunden erheblich variieren kann und bei gesunden Hunden und Katzen physiologischerweise starken Schwankungen unterworfen ist (OSBORNE et al., 1995; VAN VONDEREN et al., 1997; WILLARD & TVEDTEN, 2006b; RUDINSKY et al., 2019a). Eine weite Spanne konnte auch in der vorliegenden Studie gezeigt werden: das USG von klinisch unauffälligen Hunden reichte von 1.019 bis zu 1.065; das USG der klinisch normalen Katzen reichte von 1.020 bis zu 1.042. In der Literatur sind für die Interpretation des USG und somit der Nierenkonzentrationsfähigkeit definierte Cut-Off-Werte (USG > 1.030 für Hundeurinproben und USG > 1.035 für Katzenurinproben) genannt (OSBORNE et al., 1995; WATSON, 1998; REINE & LANGSTON, 2005). Wichtig dabei ist, dass nur persistierend niedrige Werte des USG auf eine reduzierte Konzentrationsfähigkeit der Niere hinweisen (WATSON, 1998). Die Beurteilung der Nierenkonzentrationsfähigkeit sollte niemals auf einer einzelnen Messung des USG und strikt betrachteten Cut-Off-Werten basieren, da dies schnell zu falschen Schlussfolgerungen führen kann. Liegt ein grenzwertiges USG vor, sollte dieses durch eine wiederholte Messung überprüft werden.

Bisher gab es wenige Studien, die die Notwendigkeit der Verwendung eines Refraktometers mit Katzenskala für die Messung des USG untersuchten. In einer Studie wurden die USG-Messungen von fünf Refraktometern verglichen (TVEDTEN et al., 2015). Ein in dieser Studie verwendetes Refraktometer besaß separate Skalen für Katzen- und Hundeurinproben, ein weiteres Refraktometer war für die ausschließliche Messung von Katzenurin bestimmt (TVEDTEN et al., 2015). Die Messungen wurden zusätzlich mit Referenzmethoden (Pyknometrie und Feststoffe) verglichen. Interessanterweise ergaben die beiden Refraktometer für Katzenurin im Vergleich mit den Referenzmethoden konstant niedrigere Werte und die niedrigsten Werte verglichen mit den anderen Refraktometern. Dies führte

zu dem Schluss, dass die Refraktometer für Katzenurin falsch niedrige Werte zeigten. In einer anderen Studie wurde ein humanmedizinisches Refraktometer mit einem katzenurinspezifischen Refraktometer bei insgesamt 47 Hunde- und Katzenurinproben verglichen (TVEDTEN & NOREN, 2014). In dieser Studie zeigte die Auswertung mittels Bland-Altman-Analyse einen signifikanten Unterschied für die caninen und felines Proben zwischen beiden Refraktometern. Dabei ergab sich bei zehn der Hunde- und Katzenurinproben ein USG von > 1.030 mittels humanmedizinischem Refraktometer, während das Katzenrefraktometer Werte zwischen 1.023 und 1.028 anzeigte. Es wurde jedoch nicht angegeben, wieviele der zehn Urinproben, Hunde- bzw. Katzenurinproben waren. In der vorliegenden Studie ergaben sich ebenfalls konstant niedrigere Werte bei Bestimmung des USG mittels Refraktometer mit Katzenskala (Mittelwert 1.029 bei frischem Nativurin) im Vergleich zu den Messungen mittels humanmedizinischem Refraktometer mit einheitlicher Skala (Mittelwert 1.032 bei frischem Nativurin) in den Katzenurinproben. Die Studie ergab eine absolute Bias von 0.003 für die Messung mittels Nativurin. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass sich ein Unterschied dieser Größe auf die Erstellung diagnostischer oder therapeutischer Pläne auswirkt.

In den Hundeurinproben der aktuellen Studie zeigte das Refraktometer mit einheitlicher Skala durchschnittlich höhere Ergebnisse (Mittelwert 1.0227 bei frischem Nativurin) als das Refraktometer mit separaten Skalen (Mittelwert 1.0225 bei frischem Nativurin). Bei dem Refraktometer mit einheitlicher Skala handelt es sich um ein humanmedizinisches japanisches Refraktometer. Die Skala von japanischen Refraktometern basiert auf den experimentellen Daten von gesunden japanischen Erwachsenen. In einer Studie aus Japan wurden die USG-Messungen von 275 Hunde- und 110 Katzenurinproben mittels eines japanischen humanmedizinischen Refraktometers sowie eines amerikanischen Refraktometers mit separaten Skalen für Hunde- und Katzenurinproben bestimmt (MIYAGAWA et al., 2011). Dabei zeigte das japanische Refraktometer (Mittelwert 1.020) signifikant höhere Werte sowohl bei Hunde- als auch bei Katzenurinproben im Vergleich zu dem Refraktometer aus den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) (Mittelwert 1.018). Dieser Unterschied von 0.002 wurde von den Autoren als klinisch relevant angesehen, da Patienten aufgrund von falschen Cut-Off-Werten falsch klassifiziert werden könnten. Wie bereits diskutiert, bestehen bei gesunden

Hunden und Katzen physiologischerweise starke Schwankungen des USG, und die Klassifikation eines Patienten basierend auf einem einzelnen Wert des USG kann leicht zu falschen Schlussfolgerungen führen. Betrachtet man zudem die je nach Literaturstelle variierenden Einteilungen der Isosthenurie von 1.007 bis 1.015 (SYME & JEPSON, 2017) bzw. 1.008 bis 1.012 (GRAUER, 1999) wird ebenfalls deutlich, dass strikte Cut-Off-Werte problematisch sind. Wiederholte Messungen des USG und das Heranziehen weiterer Parameter (Hydratationsstatus, Serumparameter) sind unerlässlich, um eine Aussage über die Konzentrationsfähigkeit der Niere zu treffen (GRAUER, 1999; BEHREND et al., 2019).

In der vorliegenden Studie wurde die Intraobserver-Variabilität der refraktometrischen Messungen beider Refraktometer bei der Bestimmung des USG von 378 Urinproben untersucht, indem die Messungen doppelt geblindet wiederholt bestimmt wurden. Dabei betrug der Variationskoeffizient (CV) 0 % für die Messungen beider Refraktometer sowohl für die Messungen aus Nativurin als auch aus frischem Überstand, was die Zuverlässigkeit der Refraktometer bestätigt. In einer früheren Studie wurde die Intraobserver-Variabilität von Messungen zweier Refraktometer bestimmt, indem das USG von sieben Katzen- und Hundeurinproben achtmal gemessen wurde (PARIS et al., 2012). Dabei ergab sich ein Variationskoeffizient für die Messungen des einen Refraktometers von 0,027 % und für die Bestimmungen des zweiten untersuchten Refraktometers von 0,018 %. Die Bestimmung des USG mittels Refraktometer stellt somit eine sehr zuverlässige Messmethode dar.

Bislang gibt es keine Studien zur Übereinstimmung des USG zwischen Nativurin und Überstand. In der vorliegenden Studie ergab der Vergleich des USG zwischen Nativurin und Überstand eine gute Übereinstimmung für die Messungen durch beide Refraktometer. Es zeigte sich eine absolute Bias von < -0.001 (95 %-LOA: $-0.001-0.001$) für die Messungen mit dem Refraktometer mit einheitlicher Skala und < -0.001 (95 %-LOA: $-0.002-0.001$) für die Bestimmung mittels Refraktometer mit separaten Skalen. Betrachtet man die Studien, im Rahmen derer eine Messung des USG durchgeführt wurden, wird deutlich, dass das USG in den meisten Fällen aus Nativurin bestimmt wird (TREUTLEIN et al., 2013; WHITE et al., 2016). Entgegen der aktuellen Lehrbuchmeinung, dass die Messung des USG nicht aus dem Überstand bestimmt werden sollte

(KINDRACHUCK & STAMEY, 1986), zeigte die vorliegende Studie eine hervorragende Übereinstimmung des USG zwischen Nativurin und Überstand. Somit eignen sich beide Materialien für die refraktometrische Bestimmung des USG.

Bisherige Studien, die sich mit dem Einfluss der Lagerungszeit auf das USG beschäftigten, untersuchten kürzere Lagerungszeiten von bis zu maximal sieben Tagen (ALBASAN et al., 2003; STEINBERG et al., 2009; HUNT & STEWART, 2011; VELJKOVIC et al., 2012; ADAMS et al., 2017). Dabei blieb das USG in den meisten Studien auch nach erneuter Bestimmung nach der untersuchten Lagerungszeit stabil. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss einer Lagerungszeit von bis zu sechs Monaten zu untersuchen. Dabei ergab der Vergleich zwischen frischem Nativurin und bei 4 °C gelagertem Nativurin (45 Proben; 27 canine und 18 feline Proben) sowie zwischen frischem Überstand und bei -20 °C gelagertem Überstand (71 Proben; 41 canine und 30 feline Proben) keinen statistisch signifikanten Unterschied. Eine frühere Studie, die den Einfluss der Lagerungszeit von 24 Stunden auf das USG bei 31 Hunde- und acht Katzenurinproben untersuchte, ermittelte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss der Lagerung auf das USG (ALBASAN et al., 2003). Das USG wurde in dieser Studie innerhalb von 60 Minuten nach Uringewinnung bestimmt. Die Proben wurden bei 6 °C und 20 °C gelagert und das USG erneut nach sechs und 24 Stunden ermittelt. Eine humanmedizinische Studie konnte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen des USG ermitteln (VELJKOVIC et al., 2012). Hier wurde bei 83 Urinproben das USG innerhalb von zwei Stunden nach Uringewinnung und erneut nach vier Stunden, jeweils bei Raumtemperatur, gemessen. Es zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der Proben mit einer Konkordanz von 99 % und einer kompletten Übereinstimmung von 76 %. STEINBERG und Mitarbeiter untersuchten die Veränderungen des USG von 15 in Spritzen gelagerte Hundeurinproben in einstündigen Intervallen bis zu fünf Stunden Lagerungszeit (STEINBERG et al., 2009). Bei sieben Proben zeigte das USG keine Veränderungen, bei sieben Proben stieg das USG um 0.001, und bei lediglich einer Probe erhöhte sich das USG um 0.003. Eine weitere Studie untersuchte den Einfluss der Lagerungszeit nach 24 Stunden in Urinproben bei einer Lagerungstemperatur von 6 °C, 22 °C und einem Bereich zwischen 17 und 35 °C (HUNT & STEWART, 2011). Dabei zeigten lediglich zwei Proben eine

Veränderung des USG. Eine Probe zeigte eine Erniedrigung des USG um 0.001, bei einer Lagerungstemperatur von 6 °C und 22 °C. In einer anderen Urinprobe wurde ein Anstieg des USG um 0.001 bei einer Lagerungstemperatur von 17 bis 35 °C ermittelt. Eine weitere Studie, die den Einfluss der Lagerungszeit untersuchte, ermittelte das USG von menschlichen Urinproben bei einer Temperatur von 7, 22, -20 und -80 °C (ADAMS et al., 2017). Eine erneute Bestimmung des USG erfolgte nach ein, zwei und sieben Tagen. Bei einer Lagerungstemperatur von 7 °C und 22 °C blieb das USG stabil. Bei einer Lagerungstemperatur von -20 °C zeigte sich eine Erniedrigung des USG um 0.001 nach einer Lagerungszeit von einem Tag. Nach zwei und sieben Tagen wurde ein Abfall von 0.002 ermittelt. Bei einer Lagerungstemperatur von -80 °C zeigten die Urinproben einen Abfall des USG um 0.002 nach einer Lagerungsdauer von ein, zwei und sieben Tagen (ADAMS et al., 2017). ADAMS und Mitarbeiter führten diesen Abfall des USG auf eine mögliche Verdünnung der Urinproben durch das zunächst erfolgte Einfrieren und das anschließende Auftauen zurück. In der vorliegenden Studie konnte ein derartiger Effekt nicht festgestellt werden, obwohl eine identische Lagerungstemperatur von -20 °C gegeben war und die Proben vor einer erneuten Messung auf Raumtemperatur erwärmt wurden.

Die gute Übereinstimmung sowohl zwischen frischem und gelagertem Nativurin als auch zwischen frischem und gelagertem Überstand mit einer Bias von < 0.001 bzw. < -0.001 zeigen, dass sowohl Nativurin als auch Überstand über eine längere Zeit ohne signifikanten Einfluss auf das USG gelagert werden können. Diese Tatsache könnte gerade in Labors von Bedeutung sein, in denen eine wiederholte Bestimmung des USG bei gelagerten Urinproben notwendig wird. Viele Labors richten sich zudem nach dem Protokoll der Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines, nach welchen Urinproben innerhalb von drei Stunden nach der Gewinnung untersucht werden und zuvor auf Eis gelagert transportiert werden sollten (RABINOVITCH, 2001). Die gute Übereinstimmung in der vorliegenden Studie zeigt, dass es für die Bestimmung des USG nicht erforderlich ist, die Proben direkt nach Gewinnung zu untersuchen, da das USG auch nach einer längeren Lagerungszeit stabil bleibt.

Die vorliegende Studie ergab eine exzellente Korrelation zwischen dem mit beiden Refraktometern gemessenem USG und der Osmolalität sowohl für die

Messungen aus frischem Nativurin (85 Proben, 49 canine und 36 feline Proben) als auch aus dem gelagerten Überstand (94 Proben, 59 canine und 35 feline Proben) mit Korrelationskoeffizienten von $r > 0,984$. Eine Studie, die die Korrelation zwischen dem USG zweier Refraktometer und Osmolalität bei Katzenurinproben bestimmte, ergab vergleichbare Ergebnisse mit ebenfalls exzellenten Korrelationskoeffizienten ($r = 0,967$ und $r = 0,960$) (BENNETT et al., 2011). Allerdings wurde die Korrelation nur bei zehn Urinproben ermittelt. Weitere Studien, die die Korrelation von USG und Osmolalität bei einer höheren Probenanzahl in Hundeurinproben untersuchten, zeigten ebenfalls eine gute Korrelation (DOSSIN et al., 2003; AYOUB et al., 2013; RUDINSKY et al., 2019b). Auch humanmedizinische Studien ermittelten gute bis exzellente Korrelationen zwischen USG und Osmolalität und lieferten vergleichbare Ergebnisse ($r = 0,960$ und $r = 0,938$) (LUFT et al., 1984; DORIZZI et al., 1987). In diesen Studien wurden entweder keine Ausschlusskriterien hinsichtlich des Probenkollektivs getroffen oder von den Autoren nicht näher ausgeführt, ob Ausschlusskriterien bezüglich des Probenmaterials getroffen wurden oder wie Patienten therapiert wurden. Somit zeigte sich in den meisten Studien trotz des heterogenen Probenmaterials eine gute Korrelation zwischen USG und Osmolalität.

Viele Studien, die die Beziehung zwischen Osmolalität und USG untersuchen, schliessen proteinurische Proben aus, da ein Einfluss des Proteins auf die Korrelation zwischen Osmolalität und USG vermutet wird (WOLF & PILLAY, 1969; LEECH & PENNEY, 1987). Bisherige Studien, die diesen Einfluss untersuchten, zeigten kontroverse Ergebnisse (VOINESCU et al., 2002; IMRAN et al., 2010; AYOUB et al., 2013). In der vorliegenden Studie konnte eine starke lineare Korrelation zwischen USG und Osmolalität ermittelt werden. Es zeigte sich kein erkennbarer Einfluss von Protein bis zu einem Gehalt von 1 g/l. Ein Anstieg des USG im Vergleich zur Osmolalität zeigte sich nur in Proben mit einem Proteingehalt von mehr als 1 g/l. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte eine Studie, die den Einfluss von Protein auf das mittels Refraktometer gemessene USG untersuchte (BURKHARDT et al., 1982). Dabei zeigte sich kein Anstieg des USG bis zu einem Proteingehalt von 1 g/l. Diese Studie untersuchte den Proteineinfluss durch die Zugabe von Albumin zu gepoolten Urinproben, die vorher kein Protein enthielten, während die vorliegende Studie den Proteineinfluss

bei natürlich proteinurischen Hunden und Katzen untersuchte. Somit zeigte sich kein Unterschied bei Urinproben mit strikt vorgegebenen gestaffelten Proteingehalten und einem Probenkollektiv unter klinischen Rahmenbedingungen, welche Urinproben mit unterschiedlichsten Proteingehalten enthielten. In einer anderen Studie stieg das refraktometrisch gemessene USG bei einem Proteingehalt von 10 g/l um 0.004 an (AUDOUIN et al., 1985). Diese Studie zeigt jedoch, dass das USG erst bei einem sehr hohen Proteingehalt ansteigt. In der vorliegenden Studie besaßen 14 von 56 Proben (25 %) eine gemessene Proteinkonzentration zwischen 0,3 und 1 g/l. 35 Proben lagen unterhalb eines Proteingehaltes von 0,3 g/l. Normale Individuen scheiden sehr kleine Mengen von Protein im Urin aus (ROTA et al., 2012) und ein Proteingehalt von bis zu 0,3 g/l kann in einem konzentrierten Urin als normal angesehen werden (GRAUER, 1999). Bereits ein Proteingehalt von 1 g/l in Urinproben stellt jedoch einen hohen Proteinwert dar, der selten bei Patientenproben vorkommt. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass in der vorliegenden Studie lediglich 7 von 56 Urinproben (12,5 %) einen Proteingehalt von mehr als 1 g/l aufwiesen. Klinisch von Bedeutung kann dieser Einfluss bei Patienten mit Glomerulopathien und stark ausgeprägter Proteinurie sein. Eine Beurteilung des USG ohne Berücksichtigung der Urinproteinkonzentration könnte hier dazu führen, dass eine begleitende tubuläre Erkrankung nicht diagnostiziert wird, da aufgrund des höheren USG von einer guten Konzentrierungsfähigkeit der Niere ausgegangen wird.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich eine schlechte Korrelation zwischen USG und Osmolalität nicht nur durch den Einfluss von Protein erklären lässt. Eine humanmedizinische Studie zeigte auch bei gesunden Patienten eine schlechte Korrelation (SOUZA et al., 2015). In dieser Studie wurde die Korrelation zwischen USG und Osmolalität aus Urinproben von 97 gesunden Personen und bei Patienten mit akuter Nierenerkrankung (95 Patienten), Glomerulopathien (118 Patienten) und chronischer Nierenerkrankung (106 Patienten) untersucht (SOUZA et al., 2015). Dabei ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,462$ bei der gemeinsamen Betrachtung aller Patientengruppen. Von den insgesamt 416 Urinproben enthielten 60 % der Proben Protein. Die Korrelation blieb jedoch auch bei Ausschluss der Urinproben, die Protein und/oder Glukose enthielten, weiterhin schlecht ($r = 0,572$). Die Korrelation in der gesunden Kontrollgruppe war ebenfalls niedrig ($r = 0,609$). Die

Gründe warum die Korrelation zwischen USG und Osmolalität niedriger ist als in anderen Studien, sind den Autoren zufolge unklar. Ein Erklärungsansatz ist, dass nicht nur Protein und Glukose einen Einfluss auf die Korrelation haben können, sondern auch andere Faktoren wie Ketonkörper, Urobilinogen oder Bilirubin eine Rolle spielen. So wurde in einer späteren Studie eine deutlich schlechtere Korrelation ($r = 0,63$) zwischen USG und Osmolalität bei Urinproben, die Protein, Glukose, Ketonkörper, Urobilinogen und Bilirubin enthielten, im Vergleich zu unauffälligen Urinproben, festgestellt (IMRAN et al., 2010). Die Autoren schlussfolgerten deshalb, dass die Bestimmung der Osmolalität bei pathologischen Urinproben der Messung des USG vorzuziehen sei.

Die Evaluation der Korrelation zwischen USG und Osmolalität erfolgte in der vorliegenden Studie durch die Bestimmung des Pearson-Korrelationskoeffizienten aus den Urinproben von frischem Nativurin und Überstand. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfolgte früher in humanmedizinischen Studien häufig als ein Indikator der Übereinstimmung zwischen zwei Messmethoden (BLAND & ALTMAN, 1986). In veterinärmedizinischen Studien wird die Korrelation immer noch häufig als Übereinstimmungsmerkmal verwendet. Es muss jedoch beachtet werden, dass ein Korrelationskoeffizient nicht die Übereinstimmung zwischen zwei Messmethoden wiedergibt, sondern die Assoziation zwischen diesen (ALTMAN & BLAND, 1983; BLAND & ALTMAN, 1986). Die Korrelation gibt somit nicht wieder, ob eine Messmethode akkurater als eine andere ist. Aus diesem Grund, könnten Leser solcher Studien falsche Rückschlüsse ziehen. Eine gute Übereinstimmung besteht lediglich, wenn die Messwerte auf der sogenannten "Line of Equality" liegen (BLAND & ALTMAN, 1986). Die beste statistische Methode zur Bestimmung der Übereinstimmung zwischen zwei Methoden ist die Bland-Altman-Analyse (BLAND & ALTMAN, 1999). Diese Methode kann jedoch beim Vergleich zwischen USG und Osmolalität aufgrund der unterschiedlichen Messeinheiten nicht angewendet werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass die Ergebnisse der refraktometrischen Messung des USG mit den verwendeten Refraktometern zwar signifikant unterschiedliche Werte liefert, diese jedoch aufgrund ihrer Größenordnung nicht von klinischer Relevanz sind. Eine Verwendung von Refraktometern mit separaten Skalen für Hunde und Katzen ist demnach nicht notwendig. Die Studie zeigt zudem eine hervorragende Übereinstimmung des

USG zwischen Nativurin und Überstand, so dass beide Materialien für die Bestimmung des USG verwendet werden können. Dies gilt sowohl für frische Proben als auch für Proben, die bis zu sechs Monate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei Urinproben mit einem Proteingehalt von $< 1\text{ g/l}$, eine sehr gute Korrelation zwischen USG und Osmolalität besteht. Somit kann mit der sehr einfach durchführbaren Messung des USG bei vielen Proben ein zuverlässiger Schluss auf die Osmolalität getroffen werden, und auf die deutlich aufwändigere Messung der Osmolalität verzichtet werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Das urinspezifische Gewicht (USG) ist ein wichtiges diagnostisches Mittel zur Beurteilung der Nierenkonzentrierungsfähigkeit. Die Messung erfolgt am häufigsten mittels Refraktometer. Seit einigen Jahren sind Refraktometer mit separaten Skalen für Hunde- und Katzenurinproben erhältlich, welche jedoch bislang nur in wenigen Studien untersucht wurden. Weiterhin könnten Faktoren wie Protein oder die Lagerungszeit einen Einfluss auf das USG haben. Ziele der vorliegenden Studie waren deshalb der Vergleich zwischen einem Refraktometer mit separaten Skalen für Hunde- und Katzenurinproben und einem Refraktometer mit einheitlicher Skala, die Bestimmung der Inter- und Intraobserver-Variabilität sowie die Untersuchung der Übereinstimmung zwischen Nativurin und Überstand. Weiterhin wurde die Korrelation zwischen USG und Osmolalität, sowie der Einfluss von Protein auf diese Korrelation und der Einfluss der Lagerungszeit von bis zu sechs Monaten auf das USG evaluiert. In der Studie wurden 252 Hunde- und 126 Katzenurinproben untersucht, welche zwischen Juni 2015 und April 2016 an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München gesammelt wurden. Das Einschlusskriterium war eine Probenmenge von mindestens 3 ml und die Möglichkeit, die Proben innerhalb einer Stunde nach Probengewinnung zu untersuchen. Von den 252 Hunde- und 126 Katzenurinproben wurden 232 Proben mittels Zystozentese, 6 Proben mittels Katheter und 140 Proben als Spontanurin gewonnen. Das USG des Nativurins wurde mittels Refraktometer mit separaten Skalen für Hunde- und Katzenurinproben (Rhino Vet 360; Reichert® Analytical Instruments, Depew, NY) und Refraktometer mit einheitlicher Skala (SPR-T2; Atago®, Tokyo, Japan) bestimmt. Die Messung erfolgte mit jedem Refraktometer zweimal durch Untersucher 1 und einmal durch Untersucher 2. Die Übereinstimmung wurde mittels Bland-Altman-Analyse aus den ersten Messergebnissen von Untersucher 1 berechnet. Die Inter- und Intraobserver-Variabilität wurde mittels Variationskoeffizient bestimmt. Nach der USG-Messung wurden die Proben für fünf Minuten bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert. Die Bestimmung des USG aus dem Überstand erfolgte mit beiden Refraktometern jeweils zweimal durch Untersucher 1. Für die Evaluation der Übereinstimmung des USG zwischen Nativurin und Überstand wurde das erste

Ergebnis der Messungen von Untersucher 1 mittels Bland-Altman-Analyse verwendet. Zur Evaluierung des Einflusses der Lagerungszeit wurde ein Teil des Überstandes jeder der 378 Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und ein Teil des Nativurins aller Proben bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Von 45 Nativurinproben (27 canine, 18 feline) und 71 Überstandsproben (41 canine, 30 feline) wurde das USG nach einer Zeitspanne von bis zu sechs Monaten durch Untersucher 1 zweimal erneut bestimmt. Der Vergleich erfolgte mittels Bland-Altman-Analyse unter Verwendung des jeweils ersten Messergebnis von Untersucher 1. Die Osmolalität wurde von 85 (49 canine, 36 feline) frischen Nativurinproben sowie von 94 (59 canine, 35 feline) gelagerten Überstandsproben mittels Gefrierpunktosmometer (Automatic semi-micro; Knauer, Berlin, Germany) gemessen. Zur Bestimmung der Korrelation zwischen USG und Osmolalität wurden die ersten USG Messungen des Nativurins sowie des gefrorenen Überstandes von Untersucher 1 verwendet. Um den Proteineinfluss zu bestimmen wurde der Proteingehalt von 56 (37 canine, und 19 feline) frischen Nativurinproben gemessen (Cobas INTEGRA® 400 plus chemistry analyzer; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) und mittels linearer Regressionsanalyse evaluiert. Eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Refraktometern ergab die Bland-Altman-Analyse mit einer absoluten Bias von < 0.001 für Hundeurinproben und 0.003 für Katzenurinproben. Die Interobserver-Variabilität ergab einen akzeptablen Wert mit einem Variationskoeffizienten von $0,5\text{ }\%$. Die Intraobserver-Variabilität war exzellent ($\text{CV } 0\text{ }\%$). Eine gute Übereinstimmung ergab sich zwischen den USG Messungen aus Nativurin und Überstand. Es zeigte sich eine exzellente Korrelation zwischen USG und Osmolalität ($r = 0,98\text{--}0,99$, $p < 0.001$). Es konnte kein Einfluss des Proteins bis zu einem Gehalt von 1 g/l sowie der Lagerungszeit ($p = 0,08\text{--}1,00$) gezeigt werden. Der festgestellte Unterschied zwischen beiden Refraktometern hat keine klinische Relevanz. Die Verwendung eines Refraktometers mit separaten Skalen für Hund- und Katzenurin zur Bestimmung des USG ist somit nicht unbedingt notwendig. Für die Messung des USG kann sowohl der Nativurin als auch der Überstand verwendet werden. Der Einfluss des Proteingehaltes bis zu 1 g/l ist vernachlässigbar. Auch länger eingelagerter Urin kann zur Bestimmung des USG verwendet werden ohne zur Beeinträchtigung des Messergebnisses zu führen.

VI. SUMMARY

Urine specific gravity (USG) is an important indicator of renal concentrating ability and is usually measured by refractometry. Refractometers with separate scales for canine and feline urine samples have been available for several years, but only a few studies have examined their usefulness for measurement of USG in feline urine samples. Variables such as protein content or storage time may influence the USG. Aims of our study were to compare the measurements of USG with a refractometer with single or separate scales for canine and feline urine, to investigate inter- and intra-observer variability, and to measure agreement between whole urine and supernatant. The correlation between USG and osmolality, the influence of urinary protein on USG and osmolality, and the impact of storage time up to 6 months were investigated. 252 canine and 126 feline samples from dogs and cats presented to the Clinic of Small Animal Medicine at the Ludwig-Maximilians-University (LMU) in Munich, Germany from June 2015 to April 2016 were examined. Inclusion criteria were a minimum volume of urine of 3.0 ml and the ability to examine the samples within 1 hour of collection. Of the 252 canine and 126 feline specimens in the present study, 232 were collected via cystocentesis, 6 were catheter-derived samples, and 140 samples were free-catch. USG of fresh whole urine was determined by an optical hand-held clinical refractometer (Rhino Vet 360; Reichert® Analytical Instruments, Depew, NY) with separate scales for dogs and cats, and with an optical bench-top refractometer (SPR-T2; Atago®, Tokyo, Japan) with a single scale. USG was measured twice by observer 1 and once by observer 2. The mean differences (bias) were evaluated by Bland-Altman analysis using the first readings of observer 1. Inter- and intra-observer variability were calculated by a coefficient of variation for repeated measurements (CV). After USG measurement of fresh whole urine samples, urine specimens were centrifuged for 5 minutes at $1,500 \times g$. USG measurements from supernatant was performed twice by observer 1. The agreement between results of whole urine and supernatant was evaluated with Bland-Altman analysis using the first readings of observer 1. For evaluation of storage time, one aliquot of the supernatant and of native urine of all samples was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. USG of 45 whole urine samples (27 canine samples, 18 feline samples) and 71 supernatants (41 canine samples, 30

feline samples) were measured again after a storage time up to 6 months twice by observer 1. The comparison was performed with Bland-Altman analysis using the first measurements of observer 1. Osmolality was measured of 85 whole urine samples (49 canine, 36 feline) and of 94 supernatants (59 canine, 35 feline) with a freezing-point depression osmometer (Automatic semi-micro; Knauer, Berlin, Germany). In order to determine the correlation between USG and osmolality, USG measurements of fresh whole urine and frozen supernatant (first reading of observer 1 of each) were used. To evaluate the influence of protein on USG and osmolality, protein was determined in 56 (37 canine, 19 feline) fresh whole urine samples (Cobas INTEGRA® 400 plus chemistry analyzer; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and evaluated with linear regression analysis. There was good agreement between the 2 refractometers for measurements of USG of fresh whole urine with a mean difference (bias) of < 0.001 (95 % limits of agreement (LOA): -0.001 - 0.002) in dog samples and 0.003 (95 % LOA: 0.001 - 0.005) in cat samples. The inter-observer variability showed acceptable values ($CV < 0.5$ %) for fresh whole urine. The intra-observer variability for both refractometers of both fresh whole urine and fresh supernatant was 0 %. Good agreement was shown between USG measurements of whole urine and supernatant. Correlations between USG and osmolality were excellent ($r = 0.98$ – 0.99 , $p < 0.001$). Proteinuria up to 1 g/l had no major impact on USG or osmolality. Storage time had no significant effect on USG ($p = 0.08$ - 1.00). The difference between the refractometers is clinically irrelevant. The use of a refractometer with separate feline and canine scales is not necessary. Both whole urine and supernatant can be used for USG measurement. The influence of proteinuria < 1 g/l is negligible. Urine stored up to six months can be used for USG determination without affection of the USG measurement.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abele JE. The physical background to freezing point osmometry and its medical-biological applications. *Am J Med Electron* 1963; 2: 32-41.

Adams JD, Kavouras SA, Johnson EC, Jansen LT, Capitan-Jimenez C, Robillard JI, Mauromoustakos A. The Effect of Storing Temperature and Duration on Urinary Hydration Markers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2017; 27: 18-24.

Adams LJ. Evaluation of ames Multistix-SG for urine specific gravity versus refractometer specific gravity. *Am J Clin Pathol* 1983; 80: 871-3.

Adams WM, Adams JD, Karras EM, Rysanek E. Validity of temperature, duration, and vessel seal on 24-hour urinary hydration markers. *PLoS One* 2019; 14: e0220724.

Albasan H, Lulich JP, Osborne CA, Lekcharoensuk C, Ulrich LK, Carpenter KA. Effects of storage time and temperature on pH, specific gravity, and crystal formation in urine samples from dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 222: 176-9.

Altman DG, Bland JM. Measurement in Medicine: The Analysis of Method Comparison Studies. *Journal of the Royal Statistical Society. Series D (The Statistician)* 1983; 32: 307-17.

Assadi FK, Fornell L. Estimation of urine specific gravity in neonates with a reagent strip. *J Pediatr* 1986; 108: 995-6.

Audouin W, Couture G, Girard JC, Forest JC. [Evaluation of urinary density by AMES reagent strips and comparison to the density determined by refractometry and urinary osmolality]. *Clin Biochem* 1985; 18: 130-3.

Ayoub JA, Beaufrere H, Acierno MJ. Association between urine osmolality and

specific gravity in dogs and the effect of commonly measured urine solutes on that association. *Am J Vet Res* 2013; 74: 1542-5.

Barr JW, Pesillo-Crosby SA. Use of the advanced micro-osmometer model 3300 for determination of different formulas for calculated osmolarity and osmole gap in adult dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2008; 18: 270-6.

Barton SJ, Holmes SS. A comparison of reagent strips and the refractometer for measurement of urine specific gravity in hospitalized children. *Pediatr Nurs* 1998; 24: 480-2.

Bauer N, Rettig S, Moritz A. Evaluation the Clinitek status automated dipstick analysis device for semiquantitative testing of canine urine. *Res Vet Sci* 2008; 85: 467-72.

Behrend EN, Botsford AN, Mueller SA, Hofmeister EH, Lee HP. Effect on urine specific gravity of the addition of glucose to urine samples of dogs and cats. *Am J Vet Res* 2019; 80: 907-11.

Benitez OA, Benitez M, Stijnen T, Boot W, Berger HM. Inaccuracy in neonatal measurement of urine concentration with a refractometer. *J Pediatr* 1986; 108: 613-6.

Bennett AD, McKnight GE, Dodkin SJ, Simpson KE, Schwartz AM, Gunn-Moore DA. Comparison of digital and optical hand-held refractometers for the measurement of feline urine specific gravity. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 152-4.

Bevan DR. Osmometry. 2. Osmoregulation. *Anaesthesia* 1978a; 33: 801-8.

Bevan DR. Osmometry. 1. Terminology and principles of measurement. *Anaesthesia* 1978b; 33: 794-800.

Bevan DR. Osmometry. 3. Clinical applications. *Anaesthesia* 1978c; 33: 809-14.

Bezuidenhout K, Rensburg MA, Hudson CL, Essack Y, Davids MR. The influence of storage time and temperature on the measurement of serum, plasma and urine osmolality. *Ann Clin Biochem* 2016; 53: 452-8.

Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1: 307-10.

Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 1999; 8: 135-60.

Braun T. Wasser- und Elektrolythaushalt, Nierenfunktion. In: Braun T, Röhler gen. Riemer A, Weber F. *Kurzlehrbuch Physiologie* (in German), 1. Aufl. München: Elsevier GmbH 2006: 138-163.

Brobst D. Urinalysis and associated laboratory procedures. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1989; 19: 929-49.

Brock AP, Grunkemeyer VL, Fry MM, Hall JS, Bartges JW. Comparison of osmolality and refractometric readings of Hispaniolan Amazon parrot (*Amazona ventralis*) urine. *J Avian Med Surg* 2013; 27: 264-8.

Burkhardt AE, Johnston KG, Waszak CE, Jackson CE, Shafer SR. A reagent strip for measuring the specific gravity of urine. *Clin Chem* 1982; 28: 2068-72.

Carrieri M, Trevisan A, Bartolucci GB. Adjustment to concentration-dilution of spot urine samples: correlation between specific gravity and creatinine. *Int Arch Occup Environ Health* 2001; 74: 63-7.

Chadha V, Garg U, Alon US. Measurement of urinary concentration: a critical appraisal of methodologies. *Pediatr Nephrol* 2001; 16: 374-82.

Champion HR, Baker SP, Benner C, Fisher R, Caplan YH, Long WB, Cowley RA, Gill W. Alcohol intoxication and serum osmolality. *Lancet* 1975; 1: 1402-4.

Clemens AH, Hurtle RL. Automatic system for urine analysis. I. System design and development. Clin Chem 1972; 18: 789-93.

Costa CE, Bettendorff C, Bupo S, Ayuso S, Vallejo G. [Comparative measurement of urine specific gravity: reagent strips, refractometry and hydrometry]. Arch Argent Pediatr 2010; 108: 234-8.

Dannehower L, Kennedy E, Winchester G, Paulshock B. More on testing relative density of urine with a reagent strip. Clin Chem 1984; 30: 1584-5.

de Buys Roessingh AS, Drukker A, Guignard JP. Dipstick measurements of urine specific gravity are unreliable. Arch Dis Child 2001; 85: 155-7.

Defontis M, Bauer N, Failing K, Moritz A. Automated and visual analysis of commercial urinary dipsticks in dogs, cats and cattle. Res Vet Sci 2013; 94: 440-5.

DiBartola SP (2000a) Renal Physiology. In: DiBartola SP. Fluid Therapy in Small Animal Practice, 2. Aufl. Philadelphia: W. B. Saunders 2000: 26-44.

Dibartola SP (2000b) Disorders of Sodium and Water. In: DiBartola SP. Fluid Therapy in Small Animal Practice, 2. Aufl. Philadelphia: W. B. Saunders 2000: 45-72.

Dorizzi R, Pradella M, Bertoldo S, Rigolin F. Refractometry, test strip, and osmometry compared as measures of relative density of urine. Clin Chem 1987; 33: 190.

Dorizzi RM, Caputo M. Measurement of urine relative density using refractometer and reagent strips. Clin Chem Lab Med 1998; 36: 925-8.

Dorwart WV, Chalmers L. Comparison of methods for calculating serum osmolality from chemical concentrations, and the prognostic value of such

calculations. Clin Chem 1975; 21: 190-4.

Dossin O, Germain C, Braun JP. Comparison of the techniques of evaluation of urine dilution/concentration in the dog. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2003; 50: 322-5.

Draviam EJ, Custer EM, Schoen I. Vapor pressure and freezing point osmolality measurements applied to a volatile screen. Am J Clin Pathol 1984; 82: 706-9.

Eshar D, Wyre NR, Brown DC. Urine specific gravity values in clinically healthy young pet ferrets (*Mustela furo*). J Small Anim Pract 2012; 53: 115-9.

Finco DR (1995) Applied Physiology of the Kidney. In: Osborne LA, Finco, DR. Canine and Feline Nephrology and Urology, 1. Aufl. Baltimore: Lea & Febinger 1995: 29-46.

Forman DT, Changus GC. An automated osmometer. Clin Chem 1968; 14: 38-46.

Frew AJ, McEwan J, Bell G, Heath M, Knapp MS. Estimation of urine specific gravity and osmolality using a simple reagent strip. Br Med J (Clin Res Ed) 1982; 285: 1168.

Gangwer JR, Deidoerfer FH, Kovacs KA. A new specific gravity meter for measuring relative density on uncentrifuged urine. Clin Chem 1986; 32: 1190.

Garcia-Morales EJ, Cariappa R, Parvin CA, Scott MG, Diringer MN. Osmole gap in neurologic-neurosurgical intensive care unit: Its normal value, calculation, and relationship with mannitol serum concentrations. Crit Care Med 2004; 32: 986-91.

Gault MH, Whelan VC, Longerich LL. Assessment of specific gravity determined by Ames N-Multistix-SG. Clin Biochem 1984; 17: 292-5.

George JW. The usefulness and limitations of hand-held refractometers in

veterinary laboratory medicine: an historical and technical review. *Vet Clin Pathol* 2001; 30: 201-10.

Golob P, O'Connor W J, Potts DJ. Post-prandial drinking by dogs. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1977; 62: 275-85.

Gounden D, Newall RG. Urine specific gravity measurements: comparison of a new reagent strip method with existing methodologies, as applied to the water concentration/dilution tests. *Curr Med Res Opin* 1983; 8: 375-81.

Gouyon JB, Houchan N. Assessment of urine specific gravity by reagent strip test in newborn infants. *Pediatr Nephrol* 1993; 7: 77-8.

Grauer GF (1999) Urinary Disorders. In: Nelson RW, Couto CG. *Manual of Small Animal Internal Medicine*, St. Louis: Mosby, Inc. 1999: 355-408.

Grauer GF. Urinalysis Interpretation. *Clin Br* 2016: 93-101.

Guerrero S, Pastor J, Tvarijonaviciute A, Ceron JJ, Balestra G, Caldin M. Analytical validation and reference intervals for freezing point depression osmometer measurements of urine osmolality in dogs. *J Vet Diagn Invest* 2017; 29: 791-6.

Hager CB, Brown JR, Botero JM. Automatic system for urine analysis. II. Evaluation of the system. *Clin Chem* 1972; 18: 794-9.

Hoffman R. Osmolal gap. *Clin Toxicol* 1994; 32: 97.

Hunt AP, Stewart IB. Field hydration assessment through urine analysis: effects of time delay and storage temperature. *Journal of Health, Safety and Environment* 2011; 27: 139-44.

Imran S, Eva G, Christopher S, Flynn E, Henner D. Is specific gravity a good

estimate of urine osmolality? J Clin Lab Anal 2010; 24: 426-30.

IRIS. IRIS (International Renal Interest Society) (abgerufen am 26.12.2019).
Verfügbar unter: <http://www.iris-kidney.com/guidelines>. 2019.

Jamison RL, Robertson CR. Measuring specific gravity of urine. Lancet 1982; 2: 1396-7.

Kagan BM. A simple method for the estimation of total protein content of plasma and serum. I. A falling drop method for the determination of specific gravity. J Clin Invest 1938; 17: 369-72.

Khorami MH, Hashemi R, Bagherian-Sararoudi R, Sichani MM, Tadayon F, Shahdoost AA, Arezegar SH. The assessment of 24 24-h urine volume by measurement of urine specific gravity with dipstick in adults with nephrolithiasis. Adv Biomed Res 2012; 1: 86.

Kindrachuck RW, Stamey TA (1986) Urinalysis. In: Walsh PC, Gittes RF, Perlmutter AD, Stamey TA. Campbell's Urology, edn. Philadelphia: W. B. Saunders 1986: 285-311.

Kirschbaum BB. Evaluation of a colorimetric reagent strip assay for urine specific gravity. Am J Clin Pathol 1983; 79: 722-5.

Knapp MS. Urine specific gravity test strips. Lancet 1982; 2: 1340.

Ko K, Kwon MJ, Ryu S, Woo HY, Park H. Performance Evaluation of Three URiSCAN Devices for Routine Urinalysis. J Clin Lab Anal 2015;

Kohn CW, DiBartola SP (2000) Composition and Distribution of Body Fluids in Dogs and Cats. In: Fluid Therapy in Small Animal Practice, 2. Aufl. Philadelphia: W. B. Saunders 2000: 3-25.

Koumantakis G, Wyndham LE. An evaluation of osmolality measurement by freezing point depression using micro-amounts of sample. *J Automat Chem* 1989; 11: 80-3.

Kruse JA, Cadnapaphornchai P. The serum osmole gap. *J Crit Care* 1994; 9: 185-97.

Leech S, Penney MD. Correlation of specific gravity and osmolality of urine in neonates and adults. *Arch Dis Child* 1987; 62: 671-3.

Leslie BR (1986) Normal Renal Physiology. In: Walsh PC, Gittes RF, Perlmutter AD, Stamey TA. *Campbell's Urology*, edn. Philadelphia: W. B. Saunders 1986: 75-93.

Lord RC. Osmosis, osmometry, and osmoregulation. *Postgrad Med J* 1999; 75: 67-73.

Luft FC, Aronoff GR, Walker NA, Sloan RS, Fineberg NS. Determining specific gravity of urine with reagent sticks. *Clin Chem* 1984; 30: 582-3.

Magath TB. A hydrometer for quick and accurate determination of specific gravity in urine. *Am J Clin Pathol* 1955; 25: 1217-9.

Marsh DJ (1983) Urinary Concentration and Dilution. In: Massry SG, Glasscock RJ. *Textbook of Nephrology*, 5. Aufl. Baltimore: Williams and Wilkins 1983: 1.59-1.65.

Miles BE, Paton A, De Wardener HE. Maximum urine concentration. *Br Med J* 1954; 2: 901-5.

Miller RB (1983) Urinalysis. In: Massry SG, Glasscock RJ. *Textbook of Nephrology*, 5. Aufl. Baltimore: Williams and Wilkins 1983: 11.3-11.24.

Miller RC, Brindle E, Holman DJ, Shofer J, Klein NA, Soules MR, O'Connor KA. Comparison of specific gravity and creatinine for normalizing urinary reproductive hormone concentrations. Clin Chem 2004; 50: 924-32.

Minton DM, O'Neal EK, Torres-McGehee TM. Agreement of urine specific gravity measurements between manual and digital refractometers. J Athl Train 2015; 50: 59-64.

Miyagawa Y, Tominaga Y, Toda N, Takemura N. Development of correction formulas for canine and feline urine specific gravity measured using a Japanese refractometer. J Vet Med Sci 2011; 73: 679-81.

Morissette MP. Colloid osmotic pressure: its measurement and clinical value. Can Med Assoc J 1977; 116: 897-900.

Moritz A (2013) Harnapparat. In: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 7. Aufl. Stuttgart: Schattauer Verlag 2013: 420-487.

Nwaokorie E, Osborne CA. Urine specific gravity measurement and interpretation in veterinary medicine. DVM360 Magazine 2013a;

Nwaokorie E, Osborne CA. How specific is urine specific gravity? DVM360 Magazine. 2013b;

O'Connor WJ. Drinking by dogs during and after running. J Physiol 1975; 250: 247-59.

Osborne CA, Fletcher TF (1995) Applied Anatomy of the Urinary System with Clinicopathologic Correlation. In: Osborne LA, Finco DR. Canine and Feline Nephrology and Urology, 1. Aufl. Baltimore: Lea & Febinger 1995: 3-28.

Osborne CA, Stevens JB, Lulich JP, Ulrich LK, Bird KA, Koehler LA, Swanson LL (1995) A Clinician's Analysis of Urinalysis. In: Osborne LA, Finco, DR.

Canine and Feline Nephrology and Urology, 1. Aufl. Baltimore: Lea & Febinger 1995:136-205.

Osypiw JC, Watson ID, Gill G. What is the best formula for predicting osmolar gap? *Ann Clin Biochem* 1997; 34 (Pt 6): 692-3.

Paquignon A, Tran G, Provost JP. Evaluation of the Clinitek 200 urinary test-strip reader in the analysis of dog and rat urines in pre-clinical toxicology studies. *Lab Anim* 1993; 27: 240-6.

Paris JK, Bennett AD, Dodkin SJ, Gunn-Moore DA. Comparison of a digital and an optical analogue hand-held refractometer for the measurement of canine urine specific gravity. *Vet Rec* 2012; 170: 463.

Pradella M, Dorizzi RM, Rigolin F. Relative density of urine: methods and clinical significance. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1988; 26: 195-242.

Rabinovitch A. Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens. *NCCLS GP-16A2* 2001; 21(19): 4-21.

Reine NJ, Langston CE. Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample. *Clin Tech Small Anim Pract* 2005; 20: 2-10.

Rishniw M, Bicalho R. Factors affecting urine specific gravity in apparently healthy cats presenting to first opinion practice for routine evaluation. *J Feline Med Surg* 2015; 17: 329-37.

Rocco RM. Letter: Volatiles and osmometry. *Clin Chem* 1976; 22: 399.

Rose BD, Post TW (2001a) Introduction to Renal Function. In: *Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders*, 5. Aufl. New York: McGraw-Hill 2001: 3-20.

Rose BD, Post TW (2001b) Renal Circulation and Glomerular Filtration Rate. In: Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders, 5. Aufl. New York: McGraw-Hill 2001: 21-70.

Rose BD, Post TW (2001c) Meaning and Application of Urine Chemistries. In: Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders, 5. Aufl. New York: McGraw-Hill 2001: 405-414.

Rose BD, Post TW (2001d) Proximal Tubule. In: Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders, 5. Aufl. New York: McGraw-Hill 2001: 71-111.

Rose BD, Post TW (2001e) Functions of the Distal Nephron. In: Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders, 5. Aufl. New York: McGraw-Hill 2001: 143-162.

Rose BD, Post TW (2001f) Loop of Henle and the Countercurrent Mechanism. In: Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders, 5. Aufl. New York: McGraw-Hill 2001: 112-142.

Rota C, Biondi M, Trenti T. Evaluation of Aution Max AX-4030 and 9UB Uriflet, 10PA Aution Sticks urine dipsticks in the automated urine test strip analysis. Clin Chem Lab Med 2012; 50: 139-46.

Rubini ME, Wolf AV. Refractometric determination of total solids and water of serum and urine. J Biol Chem 1957; 225: 869-76.

Rudinsky A, Cortright C, Purcell S, Cordner A, Lord L, Wellman M, DiBartola S, Chew D. Variability of first morning urine specific gravity in 103 healthy dogs. J Vet Intern Med 2019a; 33: 2133-7.

Rudinsky AJ, Wellman M, Tracy G, Stoltenberg L, DiBartola SP, Chew DJ. Variability among four refractometers for the measurement of urine specific gravity and comparison with urine osmolality in dogs. Vet Clin Pathol 2019b; 48:

702-9.

Schweighauser A, Francey T (2017) Notfälle des Harntraktes. In: Sigrist N. Notfallmedizin für Hund und Katze (in German), 1. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag in Georg Thieme Verlag 2017: 327-345.

Schwendenwein I, Moritz, A. (2019) Harnuntersuchung. In: LaborSkills (in German), 1. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2019: 39-51.

Seshia S, Dickinson RM. What is your diagnosis? Urine from a dog. Vet Clin Pathol 2020;

Silbernagel S, Despopoulos A (2007) Niere. In: Silbernagel S und Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie (in German), 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2007: 148-187.

Simerville JA, Maxted WC, Pahira JJ. Urinalysis: a comprehensive review. Am Fam Physician 2005; 71: 1153-62.

Smart L, Hopper K, Aldrich J, George J, Kass P, Haskins S. The effect of hetastarch (670/0.75) on urine specific gravity and osmolality in the dog. J Vet Intern Med 2009; 23: 388-91.

Smith C, Arbogast C, Phillips R. Effect of x-ray contrast media on results for relative density of urine. Clin Chem 1983; 29: 730-1.

Souza AC, Zatz R, de Oliveira RB, Santinho MA, Ribalta M, Romao JE, Jr., Elias RM. Is urinary density an adequate predictor of urinary osmolality? BMC Nephrol 2015; 16: 46.

Steinbach S, Neiger R, Haller M, Nickel R, Suter PF (2017) Harnwegserkrankungen, Nephrologie, Urologie. In: Kohn B, Schwarz G. Praktikum der Hundeklinik (in German), 12. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag in

Georg Thieme Verlag 2017: 861-909.

Steinbach S, Neiger R, Florian S, Grevel V (2019) Krankheiten der Niere und der ableitenden Harnwege. In: Lutz H, Kohn B, Forterre F. Krankheiten der Katze (in German), 5. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag in Georg Thieme Verlag 2019: 745-790.

Steinberg E, Drobatz K, Aronson L. The effect of substrate composition and storage time on urine specific gravity in dogs. J Small Anim Pract 2009; 50: 536-9.

Stuempfle KJ, Drury DG. Comparison of 3 Methods to Assess Urine Specific Gravity in Collegiate Wrestlers. J Athl Train 2003; 38: 315-9.

Suki WN, Ng RCK (1983) Renal Actions and Uses of Diuretics. In: Massry SG, Glasscock RJ. Textbook of Nephrology, 5. Aufl. Baltimore: Williams and Wilkins 1983: 3.158-3.173.

Sweeney TE, Beuchat CA. Limitations of methods of osmometry: measuring the osmolality of biological fluids. Am J Physiol 1993; 264: R469-80.

Syme HM, Jepson RS (2017) Clinical Approach and Laboratory Evaluation of Renal Disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC. Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat, 8. Aufl. St. Louis: Saunders Elsevier 2017: 1905-1918.

Taylor A, Walker G. Novel method for measuring specific gravity of urine. Lancet 1982; 2: 775.

Treutlein G, Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Hartmann K, Dorsch R. Follow-up protein profiles in urine samples during the course of obstructive feline idiopathic cystitis. Vet J 2013; 198: 625-30.

Tvedten HW, Noren A. Comparison of a Schmidt and Haensch refractometer and

an Atago PAL-USG Cat refractometer for determination of urine specific gravity in dogs and cats. *Vet Clin Pathol* 2014; 43: 63-6.

Tvedten HW, Ouchterlony H, Lilliehook IE. Comparison of specific gravity analysis of feline and canine urine, using five refractometers, to pycnometric analysis and total solids by drying. *N Z Vet J* 2015; 63: 254-9.

van Vonderen IK, Kooistra HS, Rijnberk A. Intra- and interindividual variation in urine osmolality and urine specific gravity in healthy pet dogs of various ages. *J Vet Intern Med* 1997; 11: 30-5.

Veljkovic K, Rodriguez-Capote K, Bhayana V, Pickersgill R, Beattie J, Clark L, Kavsak PA. Assessment of a four hour delay for urine samples stored without preservatives at room temperature for urinalysis. *Clin Biochem* 2012; 45: 856-8.

Voinescu GC, Shoemaker M, Moore H, Khanna R, Nolph KD. The relationship between urine osmolality and specific gravity. *Am J Med Sci* 2002; 323: 39-42.

Von Engelhardt W, Breves G (2004) Niere. In: Von Engelhardt W, Breves G. *Physiologie der Haustiere* (in German), 2. Aufl. Enke Verlag 2004: 277-306.

Watson AD. Urine specific gravity in practice. *Aust Vet J* 1998; 76: 392-8.

Weisberg HF. Osmolality--calculated, "delta," and more formulas. *Clin Chem* 1975; 21: 1182-5.

White JD, Cave NJ, Grinberg A, Thomas DG, Heuer C. Subclinical Bacteriuria in Older Cats and its Association with Survival. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 1824-9.

Willard MD, Tvedten HW (2006a) Störungen des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts. In: *Labordiagnostik in der Kleintierpraxis* (in German), 1. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag 2006: 139-160.

Willard MD, Tvedten HW (2006b) Urologische Störungen. In: Labordiagnostik in der Kleintierpraxis (in German), 1. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag 2006: 161-200.

Winstead M, Sisson ND, Markey RL. Falling drop method for determination of specific gravity of urine. Am J Clin Pathol 1963; 39: 235-40.

Wiwanitkit V. Effect of storage time on dog urine. J Small Anim Pract 2010; 51: 53; author reply ; discussion

Wolf AV. Urinary concentrative properties. Am J Med 1962; 32: 329-32.

Wolf AV, Pillay VK. Renal concentration tests; osmotic pressure, specific gravity, refraction and electrical conductivity compared. Am J Med 1969; 46: 837-43.

Worthley LI, Guerin M, Pain RW. For calculating osmolality, the simplest formula is the best. Anaesth Intensive Care 1987; 15: 199-202.

Wyness SP, Hunsaker JJH, Snow TM, Genzen JR. Evaluation and analytical validation of a handheld digital refractometer for urine specific gravity measurement. Pract Lab Med 2016; 5: 65-74.

Zack JF, Jr. Evaluation of a specific gravity test strip. Clin Chem 1983; 29: 210.

VIII. ANHANG

JVDI: Supplementary material

Mösch M, et al. Influence of preanalytic and analytic variables in canine and feline urine specific gravity measurement by refractometer

Supplementary Table 1. Presenting complaints for the 252 dogs and 126 cats of our urine specific gravity study.

	Dogs	Cats
Acute kidney injury	6	5
Adenocarcinoma	0	1
Alopecia	1	2
Allergic skin disease	1	1
Ameloblastoma	1	0
Anorexia	1	0
Apathy	8	3
Ascites	2	0
Borreliosis	1	0
Chronic kidney disease	14	21
Clinically normal	30	10
Cystitis	13	15
Cystolithiasis	10	10
Diabetes	4	3
Dyspnea	3	0
Ectopic ureter	2	0
Epilepsy	9	1
Fibrosarcoma	3	18
Gastroenteritis	21	9
Glioma	4	0
Heartworm disease	1	0
Hemangiosarcoma	1	0
Hepatitis	5	1
Hyperadrenocorticism	20	0
Hyperthyroidism	0	3
Hypoadrenocorticism	3	0
Hypothyroidism	1	0
Immune-mediated hemolytic anemia	3	0
Leishmaniosis	9	0
Leptospirosis	1	0
Loss of weight	5	5

Lymphoma	1	2
Mast cell tumor	6	0
Myelofibrosis	4	0
Neurologic deficit	15	2
Otitis media	1	0
Pancreatitis	0	1
Periodontopathy	1	3
Patent ductus arteriosus	1	0
Pituitary macroadenoma	3	0
Polyuria/polydipsia	13	4
Prostatitis	2	0
Pyelonephritis	1	0
Sepsis	1	0
Squamous cell carcinoma	3	2
Thrombocytopenia	4	1
Ureterolithiasis	1	3
Urinary incontinence	12	0

Supplementary Table 2. Comparisons of agreement between the single-scale and dual-scale refractometers.

	All samples (<i>n</i> = 378)	Dog samples (<i>n</i> = 252)	Cat samples (<i>n</i> = 126)
Fresh native urine			
Mean difference	0.001	<0.001	0.003
95 % LOA	−0.002 to 0.004	−0.001 to 0.002	0.001 to 0.005
<i>p</i> value	<0.001	<0.001	<0.001
Fresh supernatant			
Mean difference	0.001	<0.001	0.003
95 % LOA	−0.002 to 0.004	−0.001 to 0.002	0.001 to 0.005
<i>p</i> value	<0.001	0.002	<0.001

LOA = limits of agreement.

IX. DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann für die Bereitstellung des spannenden Themas bedanken. Ich danke für die gute Zusammenarbeit und die konstruktiven und hilfreichen Korrekturen des Artikels.

Bei Frau Dr. Roswitha Dorsch möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung und gute Betreuung sowie die ständige und unermüdliche Bereitschaft bei Problemen und Fragestellungen zu helfen, bedanken.

Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik insbesondere den Mitarbeitern des Labors für die Unterstützung bedanken. Hier gilt mein Dank besonders Herrn Mike Holzheu.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Dr. Sven Reese für die kompetente und hilfreiche statistische Beratung.

Ein Dank geht auch an Herrn Dr. Frank Weber von der Klinik für Wiederkäuer für die Bereitstellung zur Nutzung des Osmometers sowie an Frau Hartmann für die Unterstützung bei der Messung.

Weiterhin danke ich auch Frau Dr. Karin Weber für ihre Unterstützung in labortechnischen Fragen.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung, auf die ich immer zählen kann, bedanken. Durch ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihren starken Rückhalt haben sie mir das Studium und die Doktorarbeit ermöglicht.